

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**AMANDA CAROLINE VENTURELLI**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DI-(2-ETILEXIL) FTALATO (DEHP) DURANTE A  
LACTAÇÃO E A PUBERDADE SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E  
MATURAÇÃO SEXUAL DE RATOS**

**CURITIBA**

**2014**

**AMANDA CAROLINE VENTURELLI**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DI-(2-ETILEXIL) FTALATO (DEHP) DURANTE A  
LACTAÇÃO E A PUBERDADE SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E  
MATURAÇÃO SEXUAL DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, ao  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia,  
Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino  
Andrade.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sabrina Grassioli.

**CURITIBA**

**2014**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Venturelli, Amanda Caroline

Efeitos da exposição ao Di-(2-etilexil) Ftalato (DEHP) durante a lactação e a puberdade sobre a homeostase glicêmica e maturação sexual de ratos. / Amanda Caroline Venturelli. – Curitiba, 2014.  
80 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade

Co-orientadora: Sabrina Grassioli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Insulina. 2. Hormônios. 3. Esteróides. I. Título II. Andrade, Anderson Joel Martino. III. Grassioli, Sabrina. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.1




Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **AMANDA CAROLINE VENTURELLI** no dia 25 de abril de dois mil e quatorze, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Fisiologia, intitulada: "OS EFEITOS DO DI-2 (ETILEXIL) FTALATO (DEHP) SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E MATURAÇÃO SEXUAL DE RATOS EXPOSTOS EM PERÍODOS CRÍTICOS DO DESENVOLVIMENTO", com a banca examinadora foi constituída pelos professores: Professora Doutora Sara Cristina Sagae (Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE), Professora Doutora Fabíola Iagher (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade (Universidade Federal do Paraná - UFPR), como orientador e presidente da Banca Examinadora, tendo sido **Aprovada**, sendo que a emissão do diploma da mesma ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data de emissão da mesma.

Curitiba, 25 de abril de 2014.

  
Ricardo Fernandez Perez  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez  
Vice-reitor de Ensino Superior  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia - UFPR

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR  
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br  
www.bio.ufpr.br

Dedico este trabalho ao meu pai Waldir,  
minha mãe Lurdes e meu irmão Fernando,  
que participaram ativamente das minhas realizações.  
E que me ensinaram que família é o que faz um homem  
ser verdadeiramente pleno.

## AGRADECIMENTOS

À minha **família** por todo incentivo, paciência e compreensão nos momentos de ausência e dificuldades. Pelo amor doado a cada dia, o qual me estimulou a continuar seguindo meus sonhos. Obrigada eternamente!

Ao meu orientador e exemplo profissional, **Prof. Dr. Anderson J. M. Andrade** por me acolher, confiar, apoiar e orientar durante cada detalhe do trabalho. Por estar sempre disposto a me ensinar com paciência.

Muito obrigada!

À minha co-orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Grassioli**, por me apresentar ao mundo científico e pelo auxílio prestado.

Aos parceiros de laboratório que tive o prazer e sorte de encontrar pelo caminho.

**Stefani** por toda parceria e cumplicidade, **Andrei** e **Katlyn** pelos aprendizados e alegrias que minimizaram as dificuldades diárias.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Nogueira de Moraes**, por toda contribuição em meus experimentos. E por todo aprendizado diário como profissional e como pessoa. Muito Obrigada!

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

"Chega um momento, depois de algum caminho percorrido, em que a gente pode até considerar que avançou menos do que supunha, mas entende ter avançado o máximo que conseguiu até então. E a gente agradece, com gentileza e compaixão por todos os caminhantes, porque somente quem caminha sabe o valor, o tamanho, a conquista, de que é feita a história de cada único passo."

|Ana Jácomo|

## RESUMO

Dentre as substâncias químicas ambientais que podem desregular o controle endócrino do metabolismo destacam-se os ésteres de ftalato, substâncias usadas como plastificantes ou aditivos em uma série de produtos de consumo. Evidências indicam que alguns ftalatos, como o Di-(2-etilexil)Ftalato (DEHP), podem ocasionar alterações metabólicas e/ou hormonais em fases críticas do desenvolvimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição ao DEHP durante a lactação e a puberdade sobre a homeostase glicêmica e a maturação sexual de ratos. Desta forma, em um primeiro experimento, ratas Wistar foram expostas, por via oral, ao DEHP (7,5 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia) do 1º ao 21º dia de lactação. As progenitoras foram avaliadas quanto ao ganho de peso, análises bioquímicas, concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides e teste de tolerância à insulina (ITT) ao final do tratamento. Adicionalmente, seus descendentes, machos e fêmeas, foram submetidos às mesmas análises, incluindo quantificação de insulina, concentração de metabólitos fecais de androgênios (somente machos) e registro da idade de abertura do canal vaginal e separação prepucial, considerados marcadores do início da puberdade. Em uma segunda etapa experimental, ratos machos peripuberais foram expostos ao DEHP (7,5 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia) durante 30 dias a partir do desmame (22º ao 52º dia de vida). Esses animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e concentração de metabólitos fecais de androgênios, glicocorticoides e separação prepucial ao longo do período de tratamento. O ITT, avaliação dos depósitos de gordura e análises bioquímicas foram realizadas ao final do tratamento. As progenitoras expostas oralmente ao DEHP não foram afetadas pelo tratamento, demonstrando ausência de toxicidade materna e efeitos metabólicos. Os descendentes do sexo masculino apresentaram maior vulnerabilidade à exposição ao DEHP, demonstrando alterações na homeostase glicêmica na vida adulta, caracterizada por aumento da glicemia de jejum, redução da sensibilidade à insulina e menor secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. As doses de DEHP utilizadas nesse estudo não induziram alterações no perfil androgênico e nas concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides. As descendentes do sexo feminino apresentaram respostas opostas as encontradas nos descendentes masculinos para alguns parâmetros, indicando que a exposição ao DEHP possui um padrão de resposta sexo-dependente. As concentrações de colesterol e triglicerídeos foram reduzidas em ambos descendentes expostos durante a lactação. Os animais expostos no período puberal apresentaram alterações na glicemia de jejum, mas nenhuma alteração no perfil androgênico. A administração de DEHP altera a sensibilidade à insulina e controle secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas, sendo a magnitude dos efeitos mais marcante em machos do que em fêmeas. A dose de DEHP utilizada no trabalho não induziu alterações anti-androgênicas clássicas.

**Palavras-chave:** di-(2-etilexil) ftalato; DEHP; insulina, hormônios; esteroides.



## ABSTRACT

Some environmental chemicals can disrupt the endocrine control of the metabolism. Among these chemicals, special attention has been given to phthalate esters, substances used as plasticizers or additives in a variety of products used by people in a daily basis. Evidences indicate that some phthalates, such as di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), may lead to metabolic and / or hormonal changes in critical periods of sensitivity. This study aimed to evaluate the effects of DEHP during lactation and puberty related to possible changes in the glucose homeostasis, weight gain and the concentration of fecal metabolites of steroid hormones. In the first experiment, female Wistar rats were exposed orally to DEHP (7.5 mg / kg / day and 75 mg / kg / day) from day 1 to day 21 of lactation. The dams were evaluated for weight gain, biochemical analysis, concentration of fecal glucocorticoid metabolites and insulin tolerance test (ITT) at the end of the treatment. Additionally, their descendants, male and female, were also tested for the same parameters, including quantification of insulin, concentration of fecal metabolites of androgens (male only), and the age of vaginal opening (females) and preputial separation (males), which are standard markers for the onset of puberty. In a second experimental phase, peripubertal male rats were exposed to DEHP (7.5 mg / kg / day and 75 mg / kg / day) for 30 days from weaning (22 to 52 days of age). These animals were again evaluated for weight gain and concentration of fecal metabolites of androgens, glucocorticoids and preputial separation throughout the treatment period. Evaluation of ITT, fat deposit and biochemical analysis were performed at the end of the treatment. The dams which were orally exposed to DEHP were not affected by the treatment, indicating the absence of maternal toxicity or metabolic effects. The male offspring showed higher vulnerability to the exposure to DEHP, presenting alterations in glucose homeostasis in the adult phase, characterized by increased fasting glucose, reduced insulin sensitivity and lower insulin secretion in isolated pancreatic islets. The dosage of DEHP used in this study did not induce changes in the androgenic profile and concentrations of fecal glucocorticoid metabolites. The female offspring showed some different responses to those found in the male offspring, indicating that the exposure to DEHP has a sex-dependent response pattern. A decrease in concentrations of cholesterol and triglycerides were found in both male and female offspring treated during lactation. Animals exposed during pubertal period presented changes in fasting plasma glucose, but no changes in the androgenic profile. The use of DEHP alters insulin sensitivity and secretory control of insulin in isolated pancreatic islets and more substantial responses in males than in females. The dosage of DEHP used in this study did not induce classic anti-androgenic changes.

**Keywords:** Di (2-ethylhexyl) Phthalate, DEHP, insulin, hormones, steroids.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DEHP.....	21
FIGURA 2 -	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
FIGURA 3 -	PESO CORPORAL DE PROGENITORAS TRATADAS DIARIAMENTE DO 1º AO 21º DIA DE LACTAÇÃO COM ÓLEO DE MILHO (VEÍCULO CONTROLE) OU COM O PLASTIFICANTE DEHP.....	33
FIGURA 4 -	CONSUMO DE RAÇÃO (A) E ÁGUA (B) DE PROGENITORAS TRATADAS COM VEÍCULO (CONTROLE) OU COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	34
FIGURA 5 -	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA EM PROGENITORAS EXPOSTAS AO DEHP DURANTE A LACTAÇÃO.....	37
FIGURA 6 -	CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS FECAIS DE CORTICOSTEROIDES (NG/G FEZES; MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA) EM RATAS PROGENITORAS DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	37
FIGURA 7 -	PESO CORPORAL DAS NINHADAS NO PERÍODO DE LACTAÇÃO. AS PROGENITORAS FORAM TRATADAS COM VEÍCULO OU DEHP DO 1º AO 21º DIA DE LACTAÇÃO E OS FILHOTES EXPOSTOS VIA LEITE MATERNO.....	38
FIGURA 8 -	PESO CORPORAL DOS DESCENDENTES MACHOS (A) E FÊMEAS (B) NO PERÍODO PÓS-DESMAME. AS PROGENITORAS FORAM TRATADAS COM VEÍCULO OU DEHP DO 1º AO 21º DIA DE LACTAÇÃO E OS FILHOTES EXPOSTOS VIA LEITE MATERNO.....	39
FIGURA 9 -	CONSUMO DE RAÇÃO (A) E ÁGUA (B) DOS DESCENDENTES MACHOS TRATADOS COM O VEÍCULO (CONTROLE) OU COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	40

FIGURA 10 -	CONSUMO DE RAÇÃO (A) E ÁGUA (B) DAS DESCENDENTES FÊMEAS TRATADAS COM VEÍCULO (CONTROLE) OU COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	41
FIGURA 11 -	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE (A), INSULINA (B), TRIGLICERÍDEOS (C), COLESTEROL TOTAL (D) E HDL (E) NOS DESCENDENTES MACHOS.....	44
FIGURA 12 -	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE (A), INSULINA (B), TRIGLICERÍDEOS (C), COLESTEROL TOTAL (D) E HDL (E) NAS DESCENDENTES FÊMEAS.....	45
FIGURA 13 -	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA EM RATOS MACHOS EXPOSTOS AO PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO. AS AMOSTRAS FORAM COLETADAS AOS 22, 60 E 90 DIAS DE VIDA.....	46
FIGURA 14 -	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA EM RATAS EXPOSTAS AO PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO. AS AMOSTRAS FORAM COLETADAS AOS 22, 60 E 90 DIAS DE VIDA.....	47
FIGURA 15 -	EFEITO NA SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	49
FIGURA 16 -	EFEITO NA SECREÇÃO DE INSULINA DE ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATAS FÊMEAS ADULTAS EXPOSTAS AO DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	50
FIGURA 17 -	CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECAIS DE CORTICOSTEROIDES EM DESCENDENTES MACHOS E FÊMEAS EXPOSTOS AO PLASTIFICANTE DEHP VIA LEITE MATERNO. (NG/G FEZES; MÉDIA± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	51
FIGURA 18 -	CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECAIS DE TESTOSTERONA EM DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS	

	AO PLASTIFICANTE DEHP VIA LEITE MATERNO. (NG/G FEZES; MÉDIA± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	52
FIGURA 19 -	PESO CORPORAL DE RATOS PÚBERES TRATADOS DIARIAMENTE DO 22º AO 52º DIA PÓS-NATAL COM ÓLEO DE MILHO (VEÍCULO CONTROLE) OU COM O PLASTIFICANTE DEHP.....	53
FIGURA 20 -	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA EM RATOS MACHOS TRATADOS DIARIAMENTE COM DEHP A PARTIR DO 22º DIA PÓS-NATAL. AS AMOSTRAS FORAM COLETADAS AOS 50 DIAS DE VIDA.....	56
FIGURA 21 -	CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECAIS DE CORTICOSTEROIDES EM RATOS MACHOS PÚBERES EXPOSTOS DIARIAMENTE AO PLASTIFICANTE DEHP A PARTIR DO 22º DIA PÓS-NATAL (NG/G FEZES; MÉDIA± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	57
FIGURA 22 -	CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECAIS DE TESTOSTERONA EM RATOS MACHOS NO PERÍODO PUBERTAL TRATADOS DIARIAMENTE COM PLASTIFICANTE DEHP A PARTIR DO 22º DIA PÓS-NATAL (NG/G FEZES; MÉDIA± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PESOS ABSOLUTOS (G) E RELATIVOS (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DE PROGENITORAS TRATADAS COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	35
TABELA 2 -	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONCENTRAÇÃO DE INSULINA BASAL EM PROGENITORAS TRATADAS COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE A LACTAÇÃO.....	36
TABELA 3 -	PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOS DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS AO DEHP VIA LACTAÇÃO.....	42
TABELA 4 -	PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DAS DESCENDENTES FÊMEAS EXPOSTAS AO DEHP VIA LACTAÇÃO.....	43
TABELA 5 -	SEPARAÇÃO DE PREPUCIAL, ABERTURA DO CANAL VAGINAL E O PESO CORPORAL (G) DOS DESCENDENTES MACHOS E FÊMEAS EXPOSTOS AOS DEHP.....	48
TABELA 6 -	PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOS ANIMAIS NO PERÍODO DA PUBERDADE EXPOSTOS AO DEHP DIARIAMENTE.....	54
TABELA 7 -	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS MACHOS PÚBERES EXPOSTOS AO PLASTIFICANTE DEHP.....	55
TABELA 8 -	SEPARAÇÃO DE PREPUCIAL E PESO CORPORAL (G) DOS ANIMAIS QUE FORAM EXPOSTOS AO DEHP DURANTE O PERÍODO DE PUBERDADE.....	57

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANOVA</b>	-	Análise de Variância
<b>aP2</b>	-	Adipocyte Protein 2
<b>ARQ</b>	-	Núcleo Arqueado
<b>DEHP</b>	-	Di-(2-etilexil)Ftalato
<b>DES</b>	-	Dietilestilbestrol
<b>F-6-P</b>	-	Frutose-6-Fosfato
<b>G-6-P</b>	-	Glicose-6-Fosfato
<b>HDL</b>	-	Hight Density Lipoprotein
<b>ITT</b>	-	Teste de Tolerância à Insulina
<b>Kitt</b>	-	Taxa de Decaimento da Glicose
<b>LPL</b>	-	Lipase Proteica
<b>MEHP</b>	-	Mono-etil-hexil-ftalato
<b>PCBs</b>	-	Bifenilas Policloradas
<b>Pdx-1</b>	-	Pancreatic and Duodenal Homeobox-1
<b>PPARs</b>	-	Receptores Ativados por Profiferados de Peroxissoma
<b>RIE</b>	-	Radioimunoensaio
<b>SNC</b>	-	Sistema Nervoso Central
<b>TSH</b>	-	Hormônio Estimulante da Tireoide

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	22
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	23
3.1 ANIMAIS	23
3.2 DOSES E TRATAMENTO	24
3.3 AVALIAÇÃO DAS PROGENITORAS	26
3.3.1 Concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides	26
3.3.2 Teste de tolerância à insulina	27
3.3.3 Avaliação dos depósitos de gordura e peso de órgãos	27
3.3.4 Análises bioquímicas e quantificação de insulina	27
3.4 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES	28
3.4.1 Determinação da idade de abertura do canal vaginal e separação prepucial	29
3.4.2 Avaliação dos depósitos de gordura e peso de órgãos dos descendentes na idade adulta	29
3.4.3 Isolamento de ilhotas pancreáticas	29
3.4.4 Pré-Incubação e Incubação das ilhotas isoladas	30
3.4.5 Dosagem Insulina	30
3.5 AVALIAÇÃO DE RATOS NO PERÍODO DA PUBERDADE	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
<b>4. RESULTADOS</b>	32
4.1 EXPERIMENTO 1	33
4.1.1 Dados das progenitoras	33
4.1.2 Dados dos descendentes	38
4.2 EXPERIMENTO 2	52
4.2.1 Dados dos ratos no período pubertal	52
<b>5. DISCUSSÃO</b>	59
6.1 TRATAMENTO COM DEHP E EFEITOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDIOS E HORMÔNIOS ESTEROIDES	62
6.2 TRATAMENTO COM DEHP E HOMEOSTASE GLICÊMICA	66
<b>7. CONCLUSÕES</b>	71
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	73

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, alguns estudos vêm demonstrando que muitas substâncias químicas ambientais apresentam o potencial de interferir no funcionamento do sistema endócrino. Há dados na literatura relacionando a exposição dessas substâncias, chamadas genericamente de desreguladores endócrinos, com diversas alterações na liberação, transporte, ação e eliminação de hormônios, resultando em perturbações reprodutivas, metabólicas e endócrinas em geral (BILA e DEZOTTI, 2007). Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de seres humanos e outros animais dizem respeito a quais substâncias estão associadas a efeitos deletérios e se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam representar uma ameaça à saúde humana e animal. Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, incluindo substâncias sintéticas (ex.: alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas [PCBs], bisfenol A) e naturais (ex.: fitoestrogênios) (ELOIBED e ALLISON., 2008; CASALS-CASALS *et al.*, 2011). Assim, a crescente preocupação com a exposição aos desreguladores endócrinos tem induzido o desenvolvimento e a padronização de ensaios *in vitro* e *in vivo* para identificar tais substâncias e caracterizar os efeitos biológicos decorrentes da exposição em diferentes condições.

Originalmente, os desreguladores endócrinos foram relacionados com substâncias que mimetizam a ação dos estrogênios naturais. Porém, nos últimos anos, têm sido descritas substâncias que atuam por meio de uma ampla variedade de outros mecanismos de ação, incluindo a interferência com outros receptores hormonais ou mesmo nos processos que regulam a disponibilidade de hormônios para as suas células-alvo (CASALS-CASALS *et al.*, 2011).

Os efeitos dos desreguladores endócrinos não dependem somente das suas concentrações no ambiente, mas também de outros fatores, tais como, lipofilicidade, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, e mecanismos de biotransformação e de excreção. Por exemplo, algumas substâncias sofrem biotransformação e dão origem a metabólitos ou subprodutos igualmente ou mais danosos que os compostos originais. Uma fonte de exposição bastante crítica é a presença dessas substâncias químicas nos organismos das fêmeas, que podem ser transferidas aos embriões, fetos ou filhotes através de ovos, placenta ou leite



materno e, assim, afetar o desenvolvimento. Nesse contexto, é importante destacar que os hormônios desempenham um papel essencial em muitos processos do desenvolvimento embrionário, fetal e neonatal (RINAUDO *et al.*, 2012). Nos mamíferos, alguns desreguladores endócrinos podem atravessar a barreira placentária e afetar o desenvolvimento do feto, bem como eventualmente ultrapassar a barreira hemato-encefálica e exercer seus efeitos no sistema nervoso (BILA *et al.*, 2007). De maneira geral, o período perinatal representa uma fase de grande suscetibilidade a diferentes insultos, incluindo estresse, radiação, alterações nutricionais e exposição a substâncias químicas (COLBORN *et al.*, 1993; RINAUDO *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que alterações no ambiente nutricional intrauterino e/ou neonatal em ratos podem causar alterações permanentes na estrutura e função das células beta pancreáticas e na circuitaria hipotalâmica, efeitos que podem aumentar a suscetibilidade dos animais a diversas alterações metabólicas, incluindo intolerância a glicose, obesidade e diabetes mellitus (FOWDEN e HILL, 2001; PATEL e SRINIVASAN, 2011; SEKI *et al.*, 2012). A exposição a desreguladores endócrinos durante períodos críticos do desenvolvimento, especialmente *in utero* e/ou durante lactação, é considerada particularmente preocupante, uma vez que os efeitos induzidos nessas fases são frequentemente permanentes. Em humanos, o exemplo mais claro dos efeitos causados em fetos foi o uso do potente estrogênio sintético DES (dietilestilbestrol) em mulheres grávidas, entre os anos de 1948 e 1970. Estudos epidemiológicos demonstraram que muitas crianças nascidas de mulheres que fizeram uso desse medicamento apresentaram posteriormente, na puberdade e na idade adulta, uma série de problemas de saúde, incluindo disfunções no sistema reprodutivo, gestações anormais, redução na fertilidade, desordens no sistema imunológico e câncer vaginal (BIRKETT *et al.*, 2003). Da mesma forma, a exposição a desreguladores endócrinos durante a lactação tem sido considerada extremamente preocupante, uma vez que muitos dos efeitos organizacionais dos hormônios ocorrem no período neonatal (DALSENTER *et al.*, 1997; AUHAREK *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2011).

Embora os estudos com desreguladores endócrinos tenham enfatizado principalmente os possíveis efeitos reprodutivos e carcinogênicos, a hipótese de que substâncias químicas podem afetar o controle endócrino do metabolismo energético surgiu mais recentemente, a partir de diferentes linhas de investigação. Atualmente,

o tecido adiposo é considerado um ativo órgão endócrino, capaz de secretar hormônios e de expressar diversos receptores (NEWBOLD *et al.*, 2009). Além disso, há sugestões de que a exposição *in utero* e neonatal a desreguladores endócrinos e outras substâncias químicas pode favorecer o surgimento de doenças crônicas ao longo da vida, incluindo obesidade e diabetes mellitus (HEINDEL, 2003). Há relatos descrevendo o ganho de peso em excesso em animais tratados com desreguladores endócrinos, incluindo DES e Bisfenol A (WEI *et al.*, 2011). Evidências apontam para desregulação metabólica pela exposição a substâncias químicas que interferem com a biologia do tecido adiposo, sistemas hormonais ou com o sistema nervoso central e que, dessa forma, alteram mecanismos homeostáticos envolvidos no controle de peso e na regulação dos níveis glicêmicos (GRUN e BLUMBERG, 2009).

A obesidade é frequentemente associada com distúrbios metabólicos, incluindo diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, complicações pulmonares e hepáticas, bem como outras questões de saúde, tais como problemas psicológicos, sociais, defeitos reprodutivos, e algumas formas de câncer (HATCH *et al.*, 2010). Nesse sentido, acredita-se que o aumento da incidência de doenças metabólicas não se correlaciona apenas com fatores genéticos, baixa prática de atividade física ou inapropriados hábitos alimentares, mas com substanciais alterações no ambiente químico resultante de novos procedimentos industriais e agrícolas iniciados ao longo dos últimos 60 anos. Esta mudança ambiental conduziu a hipótese de que numerosos poluentes, como os desreguladores endócrinos, possam interferir sob vários aspectos do metabolismo, o que adiciona outro fator de risco à obesidade e às patologias a ela associadas (MCALLISTER *et al.*, 2009). Estas hipóteses são sustentadas por experimentos com animais de laboratório e estudos epidemiológicos que têm demonstrado o efeito de desreguladores endócrinos na adipogênese (HATCH *et al.*, 2010). Há propostas de mecanismos que poderiam suportar associações entre desreguladores metabólicos e obesidade, incluindo efeitos sobre a glândula tireoide, alterações nos níveis de hormônios esteróides, e mecanismos de ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) - fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase glicêmica, metabolismo de lipídeos e inflamação (TAVARES *et al.*, 2007). Os PPARs são caracterizados pelo seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica, possuindo três isoformas conhecidas: PPAR-alfa, PPAR-beta e PPAR-gama. De maneira geral,

esses receptores funcionam como sensores de lipídios que cooperam em diferentes órgãos a fim de adaptar a expressão de uma série de genes ao estado metabólico do indivíduo (CASALS-CASAS e DESVERGNES, 2011). Nos adipócitos, o PPAR-gama regula a expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo de lipídios, incluindo aP2 (TONTONNOZ *et al.*, 1994), acil-CoA sintetase (SCHOONJANS *et al.*, 1995) e lipase lipoprotéica (LPL) (SCHOONJANS *et al.*, 1996). Há evidências de que esse receptor também controle a expressão de fatores envolvidos na captação de lipídios pelos adipócitos (SFEIR *et al.*, 1997). Dado que o PPAR-gama é predominantemente expresso no tecido adiposo, há hipóteses na literatura de que polimorfismos nos receptores PPAR-gama, estejam associados à obesidade (BEARMER *et al.*, 1998; RISTOW *et al.*, 1998), resistência à insulina, diabetes, hipertensão, lipodistrofia parcial, doença arterial coronariana (AGARWAL *et al.*, 2002), e aumento dos níveis de leptina no plasma (MEIRHAEGHE *et al.*, 1998). Sabe-se, também, que o gene PPAR $\gamma$ 2 é expresso nas células  $\beta$  pancreáticas, onde está envolvido na regulação da secreção de insulina (TAVARES *et al.*, 2007). A ligação de PPARs com diferentes agonistas pode resultar em um amplo espectro de efeitos, o que pode ser explicado pelas diferenças nas interações agonista-receptor e na consequente diversidade de respostas em relação a liberação de co-repressores ou recrutamento de co-ativadores desses receptores nucleares.

Dentre as substâncias químicas ambientais que revelam potencial para desregular o controle endócrino do metabolismo, destacam-se os ésteres de ftalatos, compostos químicos utilizados como plastificantes e aditivos em uma grande variedade de produtos, incluindo embalagens para alimentos, roupas, brinquedos, tintas, cosméticos e materiais médico-hospitalares. A FIGURA 1 indica a estrutura química e algumas das propriedades físico-químicas do Di-(2-etilexil) Ftalato (DEHP), um dos principais ftalatos em uso. Algumas substâncias dessa classe têm a capacidade de inibir a esteroidogênese e ocasionar múltiplas alterações endócrinas e reprodutivas em animais de laboratório. (BOTELHO *et al.* 2009; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD 2010; PARKS *et al.* 2000). Alguns estudos têm mostrado claramente a maior suscetibilidade de ratos jovens (ex.: pré-puberes e puberes) às alterações reprodutivas causadas pela exposição ao DEHP e outros ftalatos. (AKINGBEMI *et al.* 2001; GE *et al.* 2007; DOSTAL, *et al.* 1988;). Tendo em vista o papel fundamental dos hormônios esteróides no amadurecimento das funções reprodutivas durante o período peripuberal, o desequilíbrio na síntese e/ou na

sinalização desses hormônios pode afetar adversamente diferentes aspectos do desenvolvimento sexual. (GUNNARSSON et al. 2008). Esses períodos críticos do desenvolvimento são particularmente preocupantes, pois pequenas mudanças nos níveis hormonais podem provocar efeitos deletérios a longo prazo. (GRANDE et al. 2006).

Mais recentemente, tem sido sugerido que alguns ftalatos podem desregular o controle endócrino do metabolismo. Segundo Feige et al. (2007), o mono-etil-hexil ftalato (MEHP), metabólito do DEHP, está envolvido com mecanismos moleculares que modulam a sinalização do PPAR $\gamma$ , cuja ativação é célula-dependente e é capaz de promover adipogênese. Estudos realizados por Lin et al. (2011) demonstraram que a exposição materna ao DEHP nas fases de gestação e lactação é capaz de reduzir a estrutura das  $\beta$  células do pâncreas bem como a capacidade de secreção de insulina nos descendentes. Adicionalmente, os descendentes expostos *in utero* e durante a lactação, apresentaram alteração da homeostase glicêmica.

Sabe-se que o período neonatal é crítico para o desenvolvimento do pâncreas e possivelmente uma fase crítica para a indução de efeitos adversos pela exposição à desreguladores endócrinos/metabólicos como o DEHP. A exposição de neonatos e crianças a esse plastificante é extremamente preocupante em função de sua presença em uma ampla variedade de produtos industriais, incluindo embalagens para alimentos, roupas e brinquedos, além da possibilidade de exposição via leite materno. Freire e colaboradores (2006) reportaram altos níveis de ftalatos, incluindo o DEHP, em plásticos utilizados em embalagens de alimentos no Brasil. Nesse estudo, a concentração de DEHP em filmes plásticos variou de 15 a 44% (peso/peso), sendo que o percentual máximo de DEHP permitido para esse tipo de produto é de 3%. Contudo, apesar das evidências do potencial efeito desregulador endócrino do DEHP e os riscos de exposição humana, não existem dados sobre os possíveis efeitos de desregulação metabólica do DEHP, após exposição do 1° ao 21° dia de lactação.

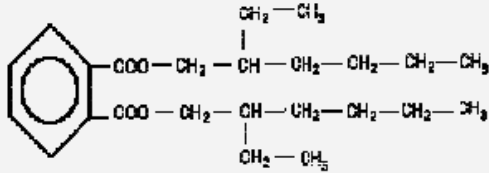
Fórmula	$C_{24}H_{38}O_4$
Sinônimos	Di (2-etilexil) ftalato (DEHP), dioctil ftalato, 1,2-ácido benzenodicarboxílico, bis (2-etilexil) éster
	
Nº de registro-CAS	117-81-7
Peso molecular	390.56
Ponto de fusão	-50°C
Ponto de ebulição	387°C
Solubilidade	45 µg/L em água a 20°C
Densidade	0.99 g/mL

FIGURA 1. Propriedades físico-químicas do DEHP.

(fonte: JAMES, T. e J. S. CENTER, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos do plastificante DEHP sobre o metabolismo e a função endócrina de ratos expostos em dois períodos críticos do desenvolvimento, a lactação e a puberdade, particularmente em relação à homeostase glicêmica, ganho de peso corporal e alterações nas concentrações de metabólitos fecais de hormônios esteróides.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar os efeitos da exposição lactacional sobre os descendentes: ganho de peso no período de lactação e pós-desmame e concentração de metabólitos fecais de androgênios e glicocorticóides no período pós-desmame; teste de tolerância à insulina nos dias 22, 60 e 90 pós-natal; dia de abertura do canal vaginal e separação prepucial (marcadores do início da puberdade); avaliação dos depósitos de gordura, análises bioquímicas (glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos), quantificação de insulina e secreção de insulina em ilhotas isoladas na idade adulta (dia 90 pós-natal).

- Investigar os efeitos do DEHP (7.5 e 75 mg/kg/dia) sobre os ratos machos tratados durante 30 dias a partir do desmame: ganho de peso e concentração de metabólitos fecais de androgênios e glicocorticóides ao longo do período de tratamento; separação prepucial; teste de tolerância à insulina (ITT), avaliação dos depósitos de gordura e análises bioquímicas (glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos) ao final do tratamento.
- Investigar os efeitos diretos do DEHP (7.5 e 75 mg/kg/dia) sobre progenitoras tratadas do 1º ao 21º dia de lactação, a fim de determinar possíveis indícios de toxicidade materna e alterações metabólicas por meio da avaliação de ganho de peso e concentração de metabólitos fecais de glicocorticóides ao longo do tratamento, avaliação dos depósitos de gordura, teste de tolerância à insulina e

análises bioquímicas (glicemia, insulina plasmática, colesterol total e triglicerídeos) ao final do tratamento.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi dividido em duas fases experimentais: o primeiro período experimental corresponde ao tratamento realizado durante a lactação em ratas progenitoras com 7,5 mg/kg/dia, 75 mg/kg/dia de DEHP e/ou óleo de milho como controle e a avaliação de seus descendentes expostos via leite materno (via indireta). O segundo período experimental corresponde ao tratamento em ratos machos pré-púberes com 7,5 mg/kg/dia, 75 mg/kg/dia de DEHP e/ou óleo de milho como controle por 30 dias a partir do desmame, período peripuberal.

No experimento 1 foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com a devida aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Instituição (CEUA), (Certificado 15096/2012). Para a obtenção das progenitoras, ratas adultas foram acasaladas com ratos machos na fase escura do ciclo de luz. O dia do nascimento foi considerado dia 1 de lactação e os filhotes foram desmamados no 21º dia. No 4º dia pós-natal foi realizado o ajuste do tamanho das ninhadas para reduzir a influência dessa variável sobre o ganho de peso dos filhotes. As ninhadas foram ajustadas de forma a compor 8 filhotes por ninhada, preferencialmente 4 machos e 4 fêmeas, sempre que possível. Ninhadas compostas exatamente por 8 filhotes foram mantidas, enquanto que em ninhadas com mais de 8 filhotes o excedente foi redistribuído para ninhadas menores a fim de compor o número de filhotes requeridos. As progenitoras e suas ninhadas ficaram alojadas individualmente em caixas de polipropileno (41x34x16 cm). Após o desmame, machos e fêmeas foram separados e mantidos agrupados por sexo.

No experimento 2, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, com a devida aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Instituição (Certificado N° 728). Foram utilizados ratos

machos com 22 dias de vida. Os animais foram mantidos em grupos de cinco ratos, agrupados por sexo e grupo experimental em moradia padrão (41x34x16 cm) com cepilho autoclavado.

Todos os animais foram alimentados com água e ração NUVILAB-CR1 (Quimtia, Colombo/PR) *ad libitum* (exceto quando indicado), e mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2 DOSES E TRATAMENTO

Para o tratamento foram utilizadas as doses de 7,5 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia de Di-(2-etilexil) ftalato (DEHP, CAS 117-81-7; Sigma-Aldrich 99% D201154) e/ou óleo de milho comercial (veículo) como controle em ambos os experimentos. Experimento 1: Ratas lactantes (n= 5 por grupo) foram tratadas diariamente por via oral (gavagem) entre os dias 1 e 21 de lactação. Experimento 2: Ratos no período peripuberal (n= 15 por grupo) foram tratados diariamente por via oral (gavagem) entre os dias 22 e 52 pós natal. Três grupos experimentais foram utilizados:

- Controle (veículo)
- DEHP 7,5 mg/kg/dia
- DEHP 75 mg/kg/dia

A menor dose foi selecionada a partir dos estudos de Lin et al. (2011) e Gayathri et al. (2004), que demonstraram alterações metabólicas após exposição a 6,25 e 7,5 mg DEHP/kg/dia, respectivamente. No estudo de Lin et al. (2011) foram observadas alterações após a exposição *in utero* e lactacional, enquanto no estudo de Gayathri et al. (2004), foram demonstrados efeitos em ratos adultos. No presente estudo, uma segunda dose, 10 vezes maior do que aquela utilizada por Gayathri et al. (2004), também foi testada. No entanto, estudos prévios de toxicologia reprodutiva demonstraram que mesmo a maior dose proposta (75 mg/kg/dia) não causa toxicidade materna (ANDRADE *et al.*, 2006a, 2006b).

A FIGURA 2 ilustra o delineamento experimental do estudo.



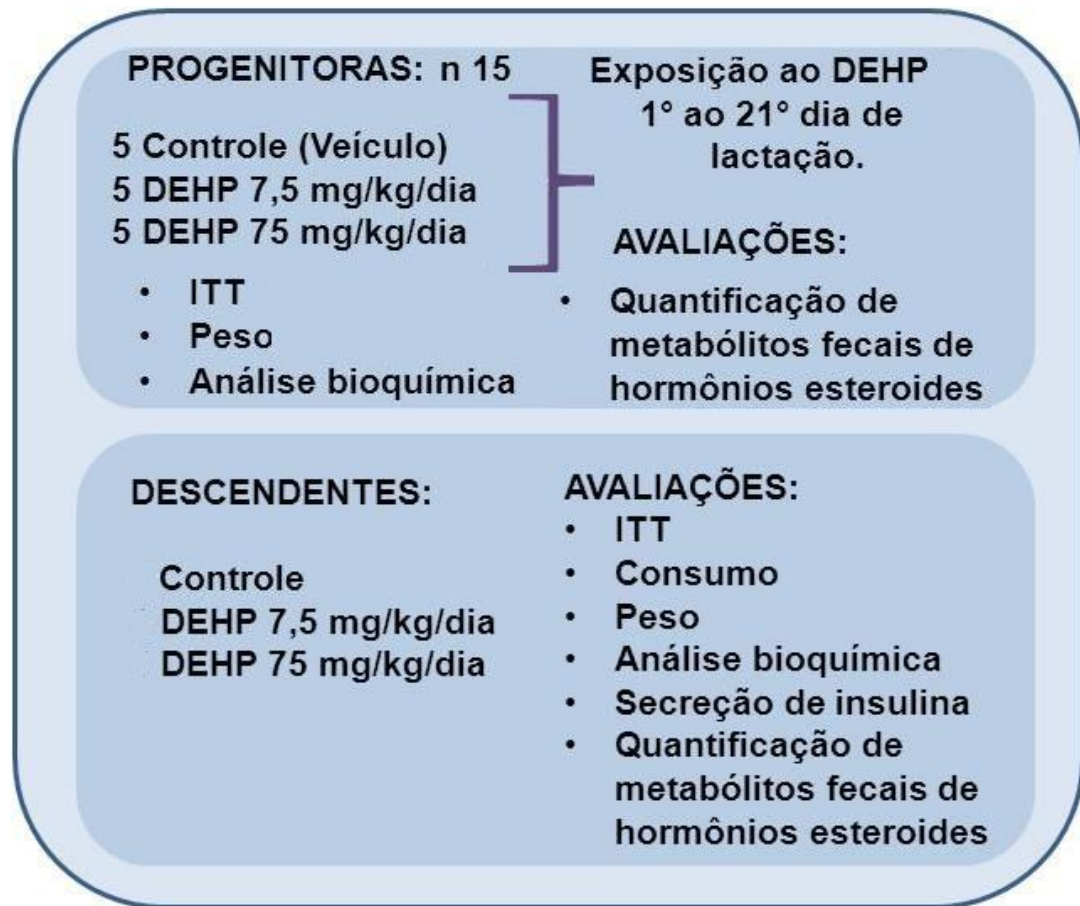
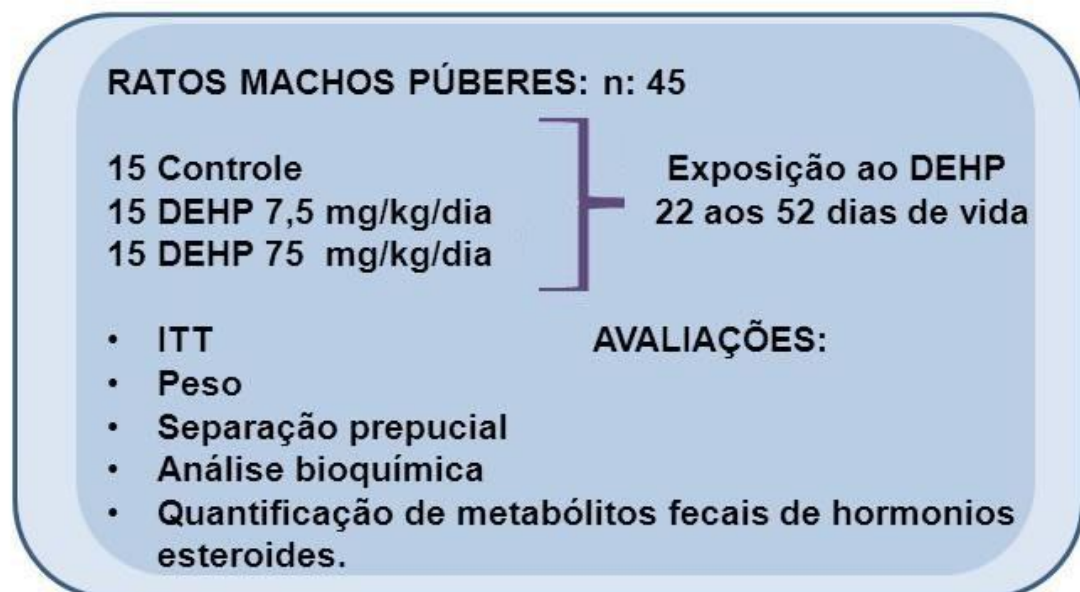
**1ª FASE EXPERIMENTAL:****2ª FASE EXPERIMENTAL:**

FIGURA 2. Delineamento experimental. ITT = Teste de tolerância à insulina.

### 3.3 AVALIAÇÃO DAS PROGENITORAS

As progenitoras foram avaliadas quanto ao ganho de peso e consumo de ração e água diariamente durante todo o período de tratamento (1º ao 21º dia de lactação). Para esses parâmetros foi calculada a área sobre a curva dos pesos ou consumos ao longo dos períodos avaliados. Além disso, foi determinada a concentração de metabólitos fecais de glicocorticóides, como descrito no item 3.3.1. Ao desmame (21º dia de lactação), as progenitoras foram avaliadas quanto à tolerância à insulina (item 3.3.2). Vinte e quatro horas após o teste de tolerância à insulina, as progenitoras foram eutanasiadas. A eutanásia foi feita por decapitação após um período de 12 horas de jejum com livre acesso à água. A decapitação foi escolhida como método de eutanásia para evitar a possível interferência de anestésicos nas medidas hormonais e bioquímicas. Foram determinados os pesos de depósitos de gordura corporal, peso de órgãos, bem como a investigação de parâmetros bioquímicos e a quantificação de insulina. Os tubos de coleta contendo heparina foram centrifugados e o plasma foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios bioquímicos e hormonais.

#### 3.3.1 Concentração de metabólitos fecais de glicocorticóides

Amostras de fezes maternas foram coletadas diariamente entre o 1º e o 21º dia de lactação. A coleta foi realizada após a troca da forração das caixas (cepilho autoclavado). O material fecal foi armazenado a -20°C para posterior extração e dosagem dos metabólitos de glicocorticóides. Os procedimentos utilizados para extração dos metabólitos de glicocorticóides fecais foram realizados de acordo com *Morais et al.* (2002) e *Brown et al.* (2004). Resumidamente, amostras de aproximadamente 0,5 g de fezes úmidas foram colocadas em tubos de ensaio de vidro, adicionando-se 5,0 mL de etanol 80% a cada amostra. A seguir, os tubos foram tampados e agitados por turbilhonamento, com pulsos de 1-2 segundos, durante 30 minutos em agitador de multi pulso (Multi-Pulse Vortexer, modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®). Em seguida, os tubos foram centrifugados (1000 g/15 min) e os extratos sobrenadantes diluídos 1:1 com solução tampão para enzimo-imunoensaio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ; pH ajustado para 7,0). Esses extratos

foram mantidos congelados ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) em tubos de microcentrífuga (do tipo eppendorf) até o momento do imunoensaio. A quantificação dos metabólitos hormonais foi feita por enzimo-imunoensaio, utilizando-se anticorpos anti-corticosterona obtidos de Coralie Munro (University of California). Os ensaios foram realizados de acordo com Brown *et al.* (2004).

### **3.3.2 Teste de tolerância à insulina**

No 21º dia de lactação, as progenitoras foram mantidas em jejum por 12 horas, tendo acesso apenas à água. Esses animais receberam a administração intraperitoneal de insulina Humalog (Lispro), correspondente a 1 unidade por 1.000 gramas de peso corporal. Foram coletados cerca de 50  $\mu\text{L}$  de sangue via caudal nos tempos 0 (antes da sobrecarga de insulina), 5, 10, 20 e 25 minutos após a sobrecarga de insulina. A concentração de glicose sanguínea foi mensurada imediatamente após a coleta por meio de um glicosímetro (Accu-chek, Roche). E a taxa de decaimento da glicose ( $K_{\text{itt}}$ ), foi calculada pelo coeficiente angular (*slope*) da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da concentração de glicose sanguínea versus o tempo, e expressa em porcentagem por minuto.

### **3.3.3 Avaliação dos depósitos de gordura e peso de órgãos**

Foram retirados e pesados os depósitos de gordura da cavidade abdominal (mesentérica e retroperitoneal) e subcutânea (inguinal). Além disso, foram pesados o fígado, rins, adrenais, baço, útero e ovários. Os dados foram expressos como pesos absolutos e relativos (peso do órgão/peso corporal x 100).

### **3.3.4 Análises bioquímicas e quantificação de insulina**

Foi realizada a quantificação plasmática de glicose, colesterol total, triglicerídeos e insulina nas amostras de plasma coletadas 24h após o teste de tolerância à insulina. Todas as análises bioquímicas foram realizadas com *kits* colorimétricos da marca *Analisa*, disponíveis comercialmente, de acordo com as

instruções do fabricante. A quantificação de insulina (radioimunoensaio) é descrita no item 3.4.5.

### 3.4 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

Os descendentes foram avaliados diariamente quanto ao ganho de peso durante todo o período de tratamento (1º ao 21º dia de lactação). Após o desmame, machos e fêmeas foram separados e mantidos de acordo com o sexo e a ninhada. O peso dos animais e o consumo de ração e água foram avaliados 3 vezes por semana do desmame até a idade adulta (dia 90 pós-natal). Para o peso corporal e consumo de ração e água foi calculada a área sobre a curva ao longo dos períodos avaliados. Da mesma forma, amostras de fezes de 24 horas foram coletadas das caixas 3 vezes por semana durante todo o período pós-desmame para posterior quantificação de metabólitos fecais de androgênios (apenas machos) e glicocorticóides. Essas amostras representaram um pool de *pellets* fecais dos animais mantidos coletivamente nas caixas, agrupados por sexo e ninhada. Os esteróides fecais foram extraídos e quantificados como descrito no item 3.3.1. Para os metabólitos fecais de androgênios foi utilizado um anticorpo anti-testosterona obtido de Coralie Munro (University of California). Os ensaios hormonais foram realizados de acordo com Brown *et al.* (2004). Dois filhotes machos e dois filhotes fêmeas por ninhada foram utilizados para os testes de tolerância à insulina, que foram realizados nos dias 22, 60 e 90 pós-natal, conforme descrito no item 3.3.2 (12 horas de jejum antes da sobrecarga de insulina). No dia 91 pós-natal, os animais foram eutanasiados (decapitação) para a determinação dos depósitos de gordura, peso de órgãos, análises bioquímicas e quantificação de insulina (conforme descrito no item 3.3.4). O sangue dos animais foi coletado por decapitação para evitar a influência de anestésicos sobre essas análises. Os tubos de coleta contendo heparina foram centrifugados e o plasma foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios. Antes da eutanasia os animais foram mantidos em jejum de 12 horas, tendo acesso somente à água. Uma parte dos animais (ao menos 4 machos e 4 fêmeas por ninhada) foram utilizados para o isolamento das ilhotas pancreáticas e quantificação de insulina após incubação com glicose (itens 3.4.3; 3.4.4 e 3.4.5).

### **3.4.1 Determinação da idade de abertura do canal vaginal e separação prepucial**

A idade de abertura do canal vaginal e a idade de separação prepucial foram investigadas como marcadores externos do início da puberdade nos descendentes expostos. As fêmeas foram avaliadas quanto ao dia de abertura do canal vaginal a partir do 35º dia pós-natal. Os descendentes masculinos foram investigados diariamente a partir do 40º dia pós-natal quanto à separação prepucial, por meio da retração manual do prepúcio. Para cada animal, foi registrado o peso corporal correspondente ao dia em que esses parâmetros foram atingidos.

### **3.4.2 Avaliação dos depósitos de gordura e peso de órgãos dos descendentes na idade adulta**

Foram retirados e pesados os depósitos de gordura da cavidade abdominal (mesentérica e retroperitoneal, epididimal [machos]) e subcutânea (inguinal). O peso do tecido marrom inter-escapular também foi avaliado. Além disso, foram pesados o fígado, rins, adrenais, baço, e órgãos reprodutivos (testículos, próstata nos machos, e útero e ovários nas fêmeas). Os dados foram expressos como pesos absolutos e relativos (peso do órgão/peso corporal x 100).

### **3.4.3 Isolamento de ilhotas pancreáticas**

Ratos adultos (91 dias) foram eutanasiados por decapitação. Imediatamente após a eutanasia foi realizada a abertura da cavidade abdominal para a localização do ducto hepático comum. Em seguida, o pâncreas foi perfundido via ducto hepático com 8 mL de Solução de Hank's, composto por 136mM NaCl; 6,45mM KCl; 1,91mM MgSO<sub>4</sub>; 0,38mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,45mM CaCl<sub>2</sub>; e contendo collagenase tipo XI na concentração de 1mg/mL. A perfusão do pâncreas foi garantida pela oclusão da porção final do ducto pancreático com auxílio de tesoura hemostática. Após a perfusão completa do órgão ele foi imediatamente transferido para um tubo

cônico contendo 5mL de Hank's, em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos e sob oxigenação (95% oxigênio/5% gás carbônico). Em seguida, o frasco foi manualmente agitado e a solução filtrada com auxílio de uma peneira de aço inoxidável. Este filtrado contendo as ilhotas foi então submetido a sucessivas lavagens em Hank' sob banho de gelo. Com auxílio de lupa e pipeta as ilhotas foram manualmente coletadas. No mínimo 4 animais por grupo foram usados para formar um "pool" de ilhotas que foram finalmente separadas em grupos de 4 e transferidas para poços contendo 1mL de solução Krebs, contendo: 120mM NaCl; 4,8mM KCl; 2,5mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2mM MgCl<sub>2</sub> e 24mM NaHCO<sub>3</sub> (SUTTON *et al.*, 1986).

#### **3.4.4 Pré-Incubação e Incubação das ilhotas isoladas**

Para todos os protocolos com ilhotas pancreáticas isoladas houve um período de 1h que antecedeu a incubação. Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas em 1mL de solução Krebs, pH 7,4, suplementado com albumina bovina (fração V), glicose (5,6mM) e aerado com uma mistura gasosa (95% oxigênio/ 5% de gás carbônico). Essa solução foi em seguida descartada e substituída pela solução de incubação.

Após a pré-incubação, os grupos de 4 ilhotas foram incubadas por mais 1h em 1mL de Krebs, pH 7,4, suplementado com albumina bovina (fração V) e aerado com uma mistura gasosa (95% oxigênio/ 5% de gás carbônico), contendo glicose em três diferentes concentrações: 5,6, 8,3 e 16,7mM. A insulina secretada após a incubação com essas diferentes concentrações de glicose foi quantificada por radioimunoensaio (item 3.4.5).

#### **3.4.5 Dosagem Insulina**

O método de radioimunoensaio (RIE) para dosagem de insulina consiste na competição de moléculas de insulina marcadas radioativamente com o iodo 125 (<sup>125</sup>I) e de moléculas de insulina não marcadas, presentes nas amostras ou padrões, por um número limitado de anticorpos específicos contra insulina. As moléculas de insulina não ligadas aos anticorpos (fração livre) foram conjugadas com carvão e, após centrifugação, separadas do sobrenadante. A leitura da radiação emitida pela

fração livre (não ligada) foi realizada em um contador Gama. A quantidade de radiação emitida é, portanto, diretamente proporcional à quantidade de insulina presente nas amostras ou padrões (BERSON, S. A; YALOW, R. S., 1968).

### **3.5 AVALIAÇÃO DE RATOS NO PERÍODO DA PUBERDADE**

Ratos machos (n=15/sexo e por grupo) foram tratados diariamente por via oral (gavagem) entre os dias 22 e 52 pós-natal. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração e água diariamente durante todo o período de tratamento. Para esses parâmetros foi calculada a área sobre a curva dos pesos ou consumos ao longo dos períodos avaliados. Além disso, foram quantificadas as concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides, como descrito no item 3.3.1 e metabólitos fecais de androgênios, onde foi utilizado um anticorpo anti-testosterona obtido de Coralie Munro (University of California). Os ensaios hormonais foram realizados de acordo com Brown *et al.* (2004). Os animais foram avaliados quanto à separação prepucial por meio da retração manual do prepúcio a partir do 40º dia de idade. Quarenta e oito horas antecedentes à eutanásia, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT) sob jejum de 12 horas, tendo acesso somente à água, como descrito no item 3.3.2. Aos 52 dias de vida os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue e tecidos. Os tubos de coleta foram centrifugados e o soro foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios bioquímicos. Antes da eutanásia os animais foram mantidos em jejum de 12 horas, tendo acesso somente à água.

Os seguintes órgãos e tecidos foram dissecados e pesados: fígado, rim, pâncreas, glândula tireoide, testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, musculo levantador do ânus, gorduras retroperitoneal, perigonadal e inguinal. Com relação aos parâmetros bioquímicos foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol. Os ensaios bioquímicos foram realizados com kits colorimétricos disponíveis comercialmente (marca LABTEST), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Bonferroni. Os dados de ganho de peso, consumo de ração e água e testes de tolerância à insulina foram analisados por ANOVA de duas vias. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foram utilizados os programas Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 5.0 e SPSS versão 13.0.

## 4. RESULTADOS

A presente seção contém os resultados do presente estudo, o qual será apresentado em dois experimentos: (a) Experimento 1, referente aos dados das progenitoras tratadas com o plastificante DEHP durante o período de lactação e a avaliação de seus descendentes machos e fêmeas expostos via leite materno. Estes dados incluem avaliação do ganho de peso, consumo de ração e água, peso de órgãos e tecidos, parâmetros bioquímicos, teste de tolerância à insulina, análise de metabólitos de glicocorticoides e testosterona (somente em descendentes machos) e avaliação da secreção de insulina; (b) Experimento 2, referente aos dados de ratos expostos ao DEHP no período de puberdade, ou seja, durante 30 dias a partir do desmame, incluindo avaliação do ganho de peso, consumo de ração e água, peso de órgãos e tecidos, parâmetros bioquímicos, teste de tolerância à insulina e análise de hormônios fecais.



## 4.1 EXPERIMENTO 1

### 4.1.1 Dados das progenitoras

#### 4.1.1.1 Ganho de peso e consumo de ração e água

O peso corporal das progenitoras, monitorado ao longo da lactação, não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (FIGURA 3). Da mesma forma, também não foram observadas alterações na ingestão de ração e água durante o período de tratamento (FIGURA 4).

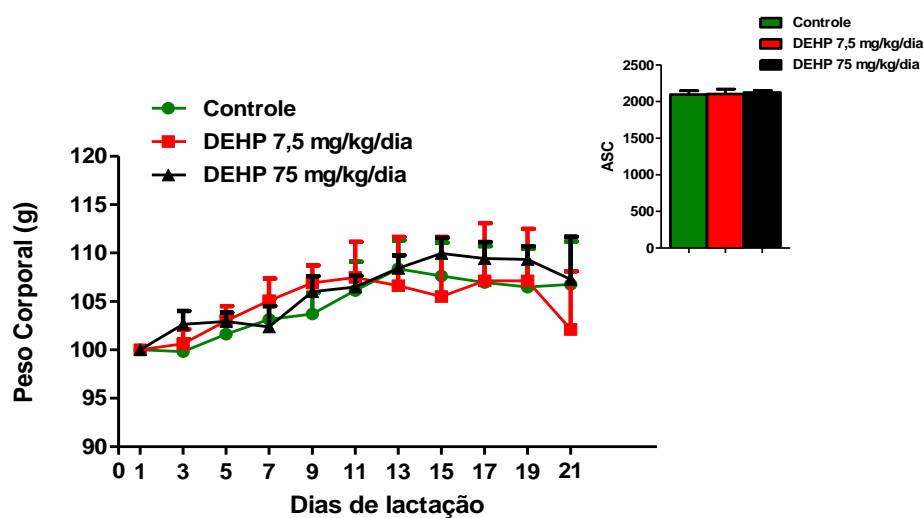


FIGURA 3. Peso corporal de progenitoras tratadas diariamente do 1º ao 21º dia de lactação com óleo de milho (veículo controle) ou com o plastificante DEHP (n = 5 ratas/grupo). ASC = área sobre a curva calculada a partir das curvas individuais de peso dos animais ao longo da lactação.

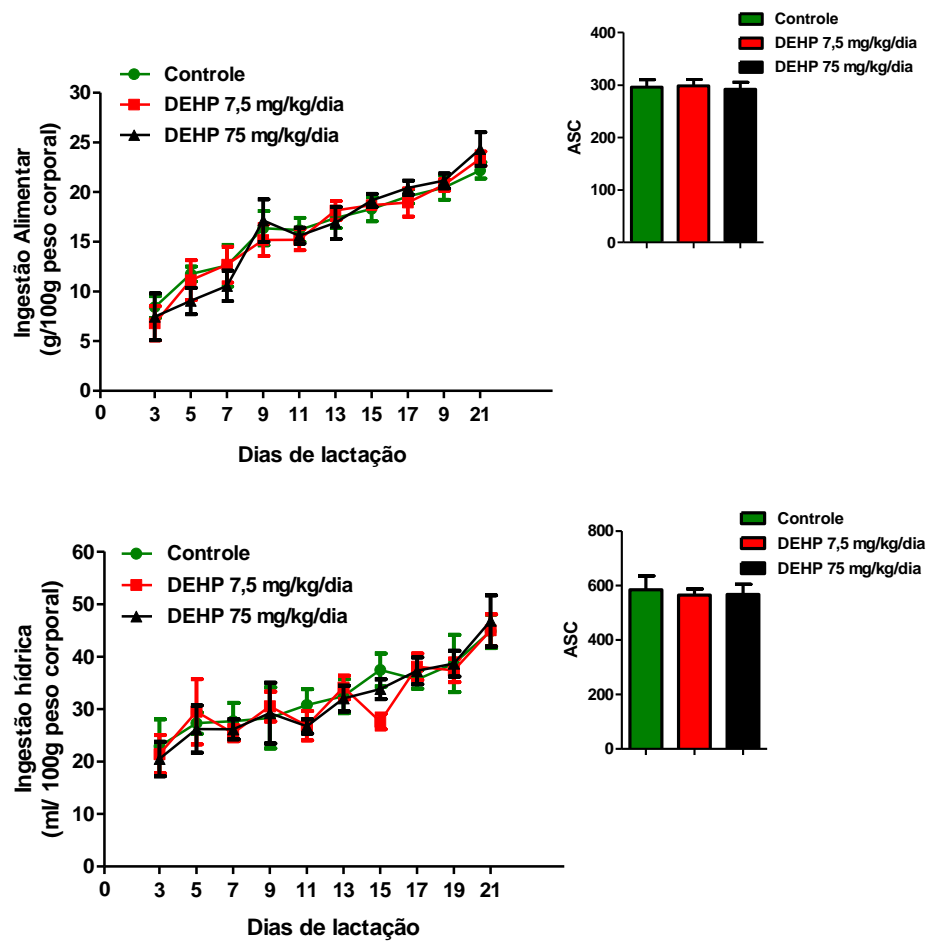


FIGURA 4. Consumo de ração (A) e água (B) de progenitoras tratadas com veículo (controle) ou com o plastificante DEHP durante o período de lactação (n=5 ratas/grupo). ASC = área sobre a curva calculada a partir das curvas individuais de peso dos animais ao longo da lactação.

#### 4.1.1.2 Peso de órgãos e tecidos e parâmetros bioquímicos

A TABELA 1 mostra os dados de pesos de órgãos e tecidos retirados das progenitoras ao final do período de tratamento. Os dados indicam que não houve diferenças significativas no peso dos órgãos e depósitos de gorduras entre os diferentes grupos experimentais. As concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e insulina também não diferiram significativamente entre os grupos (TABELA 2).

TABELA 1. PESOS ABSOLUTOS (G) E RELATIVOS (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DE PROGENITORAS TRATADAS COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Peso Corporal (g)	260,6±6,755	255,4±6,163	244,1±7,829
Retroperitoneal (g)	1,920±1,316	0,904±0,719	0,926±0,985
(%)	0,768±0,512	0,402±0,326	0,384±0,387
Ovariana (g)	2,833±2,423	1,940±1,322	1,463±0,355
(%)	1,198±1,045	1,004±0,755	0,782±0,153
Mesentérica (g)	0,954±0,621	0,862±0,279	0,578±0,224
(%)	0,508±0,382	0,370±0,117	0,368±0,356
Marrom (g)	0,192±0,059	0,176±0,065	0,192±0,058
(%)	0,168±0,186	0,074±0,027	0,080±0,017
Baço (g)	0,524±0,065	0,444±0,049	0,428±0,054
(%)	0,181±0,091	0,194±0,019	0,180±0,032
Fígado (g)	13,18±2,508	12,56±3,064	12,66±3,662
(%)	5,366±0,870	5,402±1,342	5,316±1,111
Coração (g)	0,964±0,036	0,892±0,027	0,920±0,126
(%)	0,394±0,027	0,390±0,029	0,346±0,095
Útero (g)	0,332±0,017	0,342±0,148	0,597±0,424
(%)	0,135±0,005	0,146±0,054	0,250±0,162
Adrenal (g)	0,046±0,016	0,040±0,010	0,030±0,004
(%)	0,016±0,008	0,016±0,005	0,014±0,005
Rim (g)	1,044±0,140	0,984±0,130	0,968±0,063
(%)	0,426±0,061	0,422±0,061	0,416±0,051
Ovário (g)	0,052±0,005	0,054±0,008	0,062±0,009
(%)	0,022±0,005	0,022±0,004	0,027±0,005

Os dados representam a média ± desvio padrão. As progenitoras foram tratadas do 1º ao 21º dia de lactação e os órgãos e tecidos coletados um dia após o final do tratamento. Peso relativo = (peso órgão/peso corporal) x 100. (n= 5 ratas/grupo).

TABELA 2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONCENTRAÇÃO DE INSULINA BASAL EM PROGENITORAS TRATADAS COM O PLASTIFICANTE DEHP DURANTE A LACTAÇÃO.

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Glicose Basal (mg/dL)	120,2±18,23	132,8±3,86	107,0±19,74
Insulina Basal (mg/dL)	0,235±0,15	0,357±0,29	0,279±0,14
Colesterol Total (mg/dL)	130,1±45,98	90,60±5,61	127,0±50,08
Triglicerídeos (mg/dL)	136,2±77,84	134,4±134,8	118,6±107,4

Os dados representam a média ± desvio padrão. As progenitoras foram tratadas do 1º ao 21º dia de lactação e as amostras de plasma foram coletadas 1 dia após o final do tratamento em jejum de 12 horas. (n= 5 ratas/grupo).

#### 4.1.1.3 Teste de tolerância à insulina

A FIGURA 5 ilustra os resultados do teste de tolerância à insulina, sendo representados os valores de glicemia nos tempos 0, 5, 10, 20 e 25 minutos após a administração de insulina, bem como a taxa de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ), calculada pelo coeficiente angular (*slope*) da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da concentração de glicose sanguínea versus o tempo, e expressa em porcentagem por minuto. Não houve nenhuma alteração na taxa de decaimento da glicose nas progenitoras ao 21º dia de lactação.

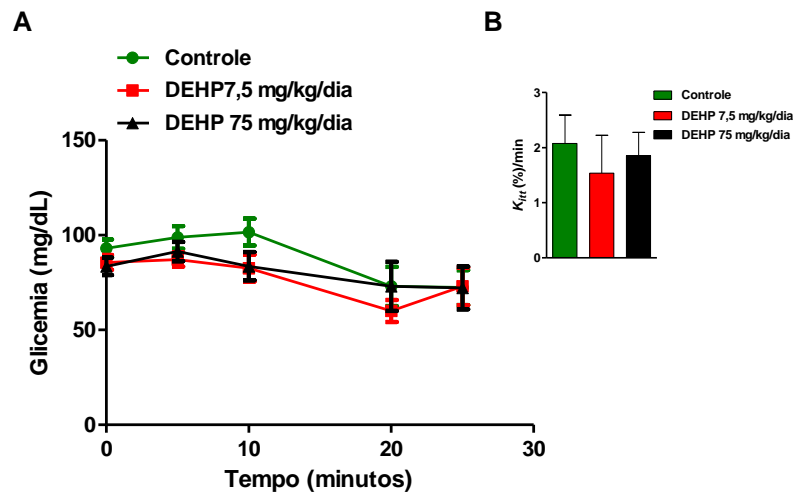


FIGURA 5. Teste de tolerância à insulina em progenitoras expostas ao DEHP durante a lactação. O gráfico A representa as concentrações de glicose em diferentes tempos após a administração de insulina. O gráfico B mostra a taxa de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ). (n=5 ratas/grupo).

#### 4.1.1.4 Metabólitos fecais de corticosteroides

A concentração de metabólitos fecais de corticosteroides monitorada ao longo da lactação não diferiu nas progenitoras tratadas diariamente com o plastificante DEHP em relação ao grupo controle. A FIGURA 6 representa a concentração dos metabólitos coletados em dias alternados a partir do 1° ao dia 21° de lactação.

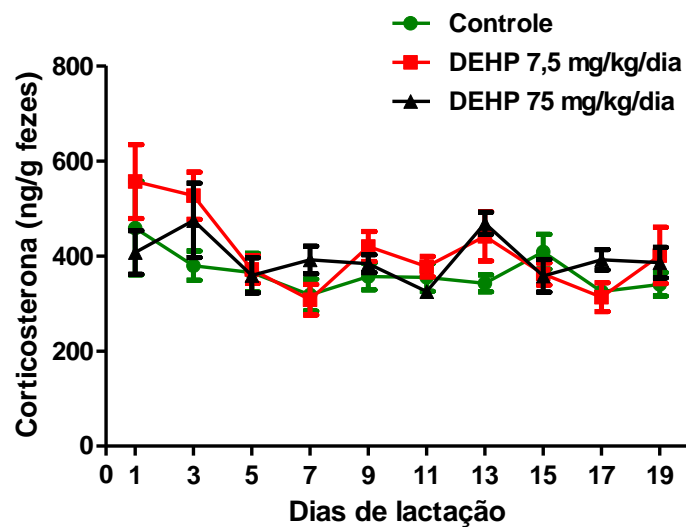


FIGURA 6. Concentração de metabólitos fecais de corticosteroides (ng/g fezes; média± erro padrão da média) em ratas progenitoras durante o período de lactação. (n= 5 ratas/grupo).

#### 4.1.2 Dados dos descendentes

##### 4.1.2.1 Ganho de peso durante a lactação e após o desmame

A FIGURA 7 ilustra o ganho de peso das ninhadas durante o período de lactação. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Da mesma forma, não houve diferença no ganho de peso de descendentes machos no período pós-desmame. No entanto, houve aumento da área sobre a curva de peso corporal de fêmeas no grupo 75 mg/kg/dia, quando comparado aos grupos controle e 7,5 mg/kg/dia no período pós-desmame (FIGURA 8).

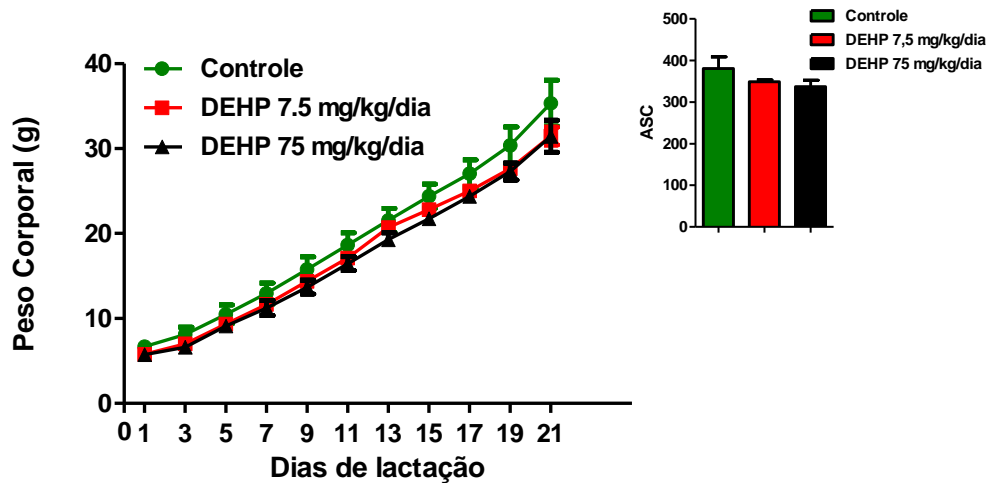


FIGURA 7. Peso corporal das ninhadas no período de lactação. As progenitoras foram tratadas com veículo ou DEHP do 1º ao 21º dia de lactação e os filhotes expostos via leite materno. (n= 5 ninhadas por grupo). ASC = área sobre a curva calculada a partir das curvas individuais de peso dos animais ao longo da lactação.

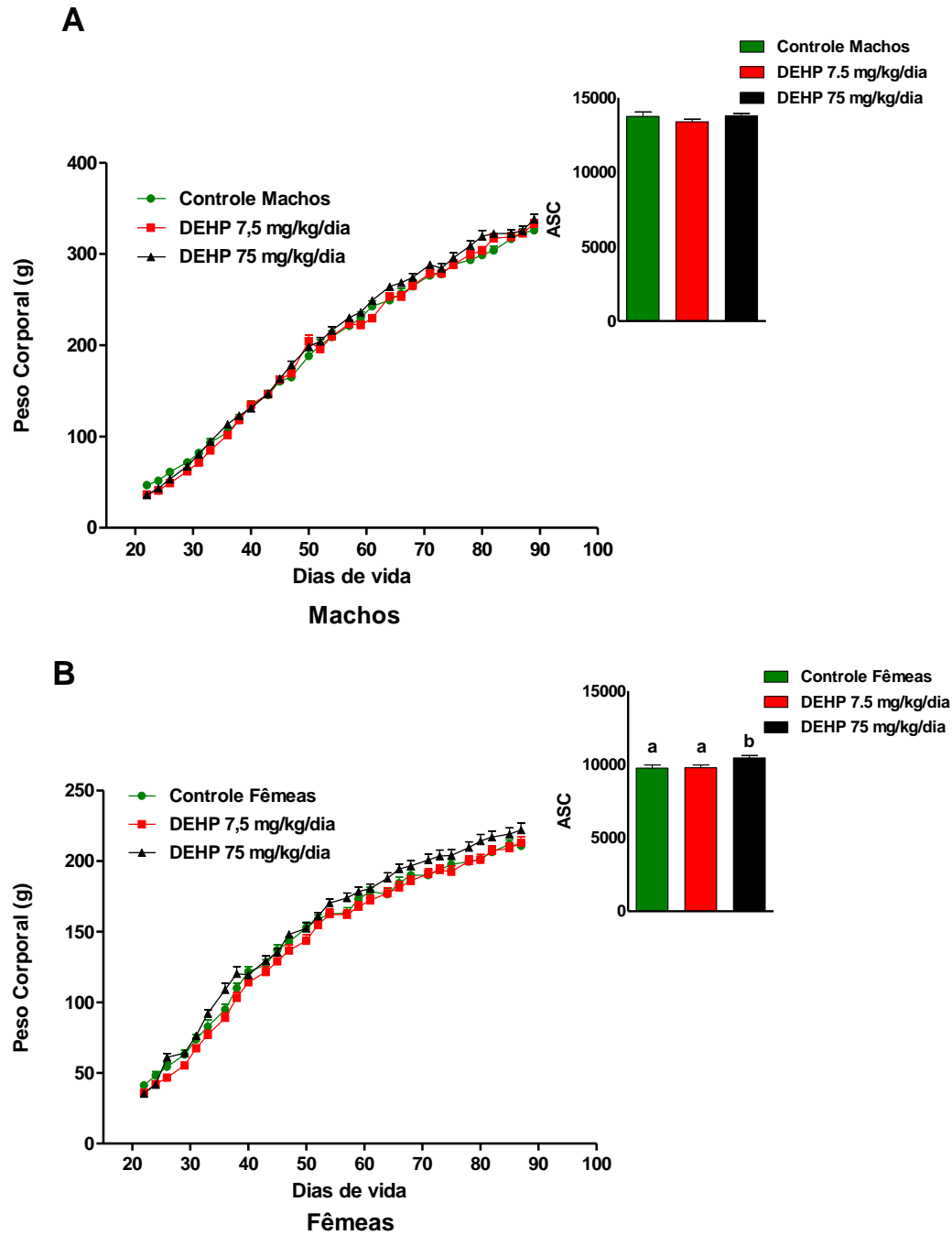


FIGURA 8. Peso corporal dos descendentes machos (A) e fêmeas (B) no período pós-desmame. As progenitoras foram tratadas com veículo ou DEHP do 1º ao 21º dia de lactação e os filhotes expostos via leite materno. (n= 17- 21 animais por grupo). ASC = área sobre a curva calculada a partir das curvas individuais de peso dos animais ao longo da lactação. As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni).

#### 4.1.2.2 Consumo hídrico e alimentar

As FIGURAS 9 e 10 representam o monitoramento do consumo hídrico e alimentar de machos e fêmeas, respectivamente, ao longo do desmame até a vida adulta (90 dias). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

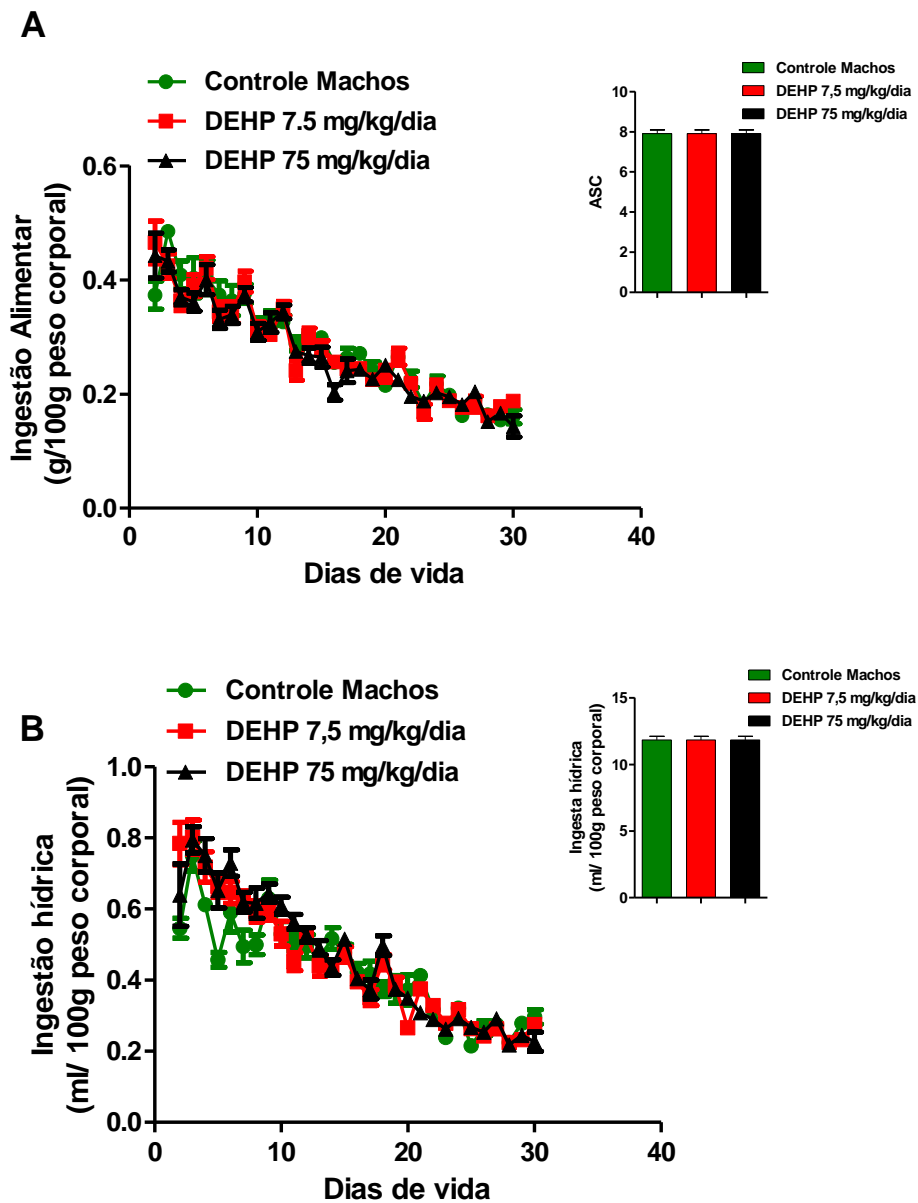


FIGURA 9. Consumo de ração (A) e água (B) dos descendentes machos tratados com o veículo (controle) ou com o plastificante DEHP durante o período de lactação (n= 19-21 ratos/grupo).



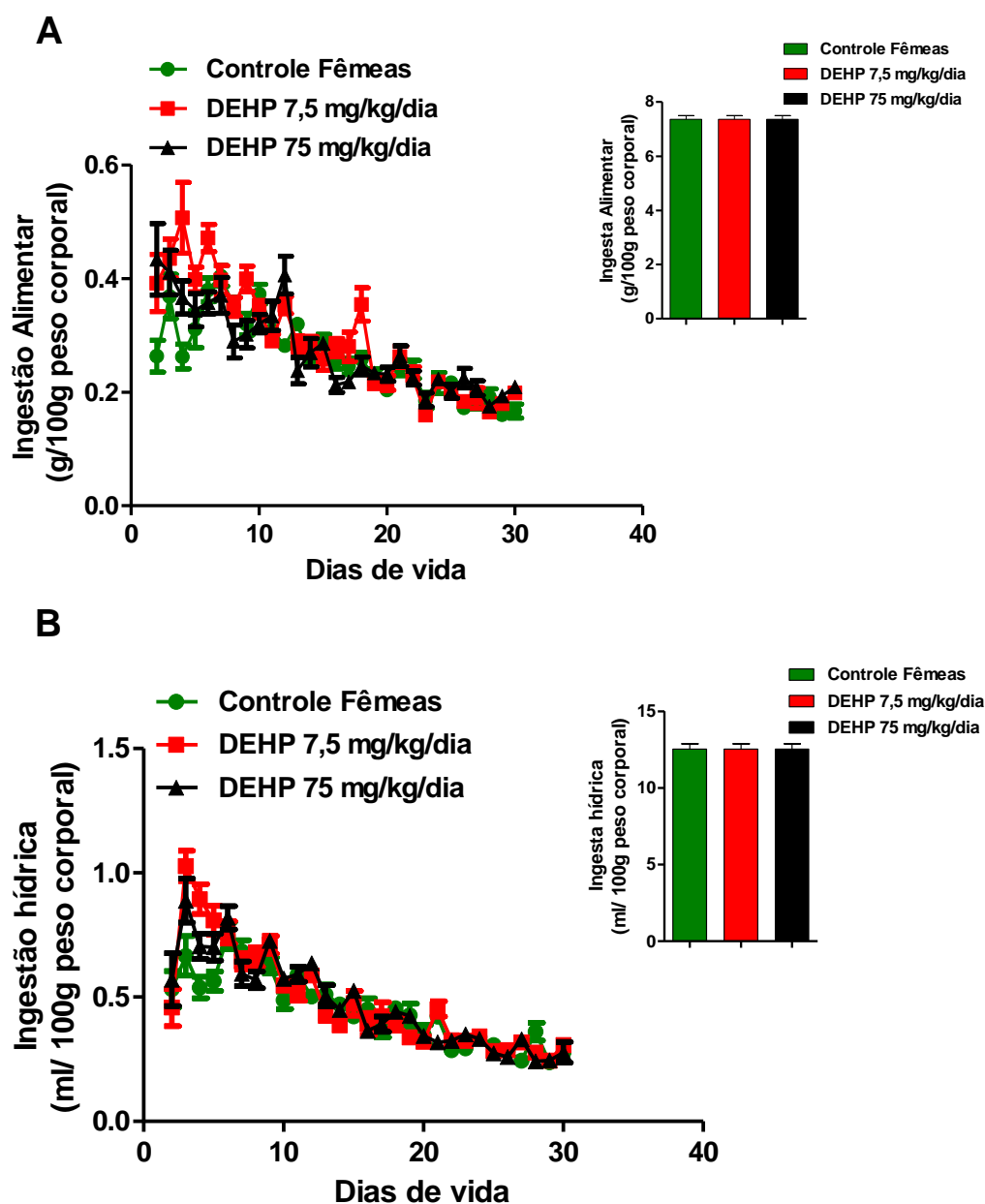


FIGURA 10. Consumo de ração (A) e água (B) das descendentes fêmeas tratadas com veículo (controle) ou com o plastificante DEHP durante o período de lactação (n= 17-19 ratas/grupo).

#### 4.1.2.3 Peso de órgãos e tecidos

As TABELAS 3 e 4 mostram os dados de pesos de órgãos e tecidos retirados dos animais adultos (dia 90 pós-natal) que foram expostos ao plastificante DEHP via lactação. Os dados indicam que houve diminuição significativa no peso relativo do baço dos descendentes machos expostos a dose de 7,5 mg/kg/dia em relação ao

grupo controle. Não houve diferença significativa nos demais órgãos e depósitos de gorduras entre os diferentes grupos experimentais.

TABELA 3. PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOS DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS AO DEHP VIA LACTAÇÃO.

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Peso corporal (g)	200,0±90,78	199,1±95,19	205,9±96,76
Retroperitoneal (g)	6,143±1,877	6,060 ±1,532	5,478±1,700
(%)	1,912±0,598	1,844±0,479	1,756±0,609
Perigonadal (g)	3,967±1,082	3,488±0,945	3,251±0,799
(%)	1,320±0,425	1,064±0,322	1,011±0,258
Inguinal (g)	0,745±0,260	0,612±0,227	0,561±0,141
(%)	0,229±0,080	0,205±0,118	0,181±0,055
Mesentérica (g)	3,965±1,811	3,087±0,601	3,453±0,889
(%)	1,224±0,505	0,881±0,327	1,104±0,359
Baço (g)	0,690±0,083	0,621±0,062	0,705±0,055
(%)	0,213±0,024 <sup>a</sup>	0,186±0,025 <sup>b</sup>	0,218±0,033 <sup>a</sup>
Fígado (g)	9,455±3,110	9,825±0,771	9,791±0,911
(%)	3,200±0,273	3,203±0,743	3,080±0,510
Coração (g)	1,158±0,089	1,181±0,104	1,233±0,130
(%)	0,360±0,030	0,378±0,084	0,386±0,067
Cérebro (g)	1,830±0,058	1,785±0,195	1,784±0,236
(%)	0,570±0,037	0,617±0,286	0,558±0,099
Próstata (g)	0,328±0,060	0,319±0,070	0,317±0,046
(%)	0,086±0,038	0,082±0,040	0,098±0,020
Adrenal (g)	0,021±0,009	0,025±0,006	0,023±0,009
(%)	0,006±0,002	0,007±0,001	0,007±0,002
Rim (g)	1,266±0,082	1,333±0,117	1,293±0,130
(%)	0,337±0,121	0,402±0,030	0,361±0,126
Testículos (g)	1,482±0,063	1,433±0,370	1,473±0,104
(%)	0,469±0,037	0,438±0,112	0,470±0,057

Os dados representam a média ± desvio padrão. Os animais foram sacrificados aos 90 dias de vida e os órgãos e tecidos foram coletados logo após o sacrifício. Peso relativo = (peso órgão/peso corporal) x 100. (n= 19 - 21 ratos/grupo). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (p< 0,05, ANOVA/Bonferroni).

TABELA 4. PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DAS DESCENDENTES FÊMEAS EXPOSTAS AO DEHP VIA LACTAÇÃO.

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Peso Corporal (g)	146,4±54,11	142,5±56,32	152,3±57,25
Retroperitoneal (g)	2,846±0,938	2,663±0,748	2,453±1,094
(%)	1,321±0,439	1,238±0,333	1,193±0,597
Ovariana (g)	6,524±2,541	5,463±1,841	5,448±1,940
(%)	3,005±1,098	2,553±0,887	2,642±1,104
Inguinal (g)	0,498±0,299	0,491±0,188	0,366±0,216
(%)	0,210±0,141	0,230±0,101	0,154±0,049
Mesentérica (g)	2,588±0,734	2,160±0,516	2,790±0,843
(%)	1,195±0,311	1,013±0,237	1,212±0,579
Baço (g)	0,539±0,054	0,485±0,058	0,528±0,062
(%)	0,248±0,020	0,224±0,037	0,251±0,049
Fígado (g)	6,717±0,473	5,866±0,428	6,267±0,724
(%)	2,871±0,889	2,536±0,855	3,018±0,586
Coração (g)	0,871±0,084	0,780±0,077	0,808±0,175
(%)	0,414±0,200	0,363±0,043	0,391±0,117
Cérebro (g)	1,697±0,158	1,756±0,058	1,775±0,049
(%)	0,789±0,080	0,788±0,166	0,848±0,081
Útero (g)	0,468±0,110	0,472±0,124	0,428±0,151
(%)	0,216±0,050	0,220±0,063	0,206±0,083
Adrenal (g)	0,030±0,005	0,032±0,008	0,030±0,006
(%)	0,011±0,004	0,014±0,005	0,011±0,004
Rim (g)	0,814±0,100	0,790±0,109	0,783±0,065
(%)	0,376±0,047	0,370±0,059	0,371±0,059
Ovários (g)	0,057±0,009	0,052±0,010	0,055±0,007
(%)	0,025±0,005	0,022±0,006	0,023±0,004

Os dados representam a média ± desvio padrão. Os animais foram sacrificados aos 90 dias de vida e os órgãos e tecidos foram coletados logo após o sacrifício. Peso relativo = (peso órgão/peso corporal) x 100. (n= 17 - 19 ratas/grupo).

#### 4.1.2.4 Parâmetros bioquímicos

A exposição ao plastificante DEHP via lactação causou aumento na concentração plasmática de glicose (FIGURA 11A) nos descendentes machos do grupo 75 mg/kg/dia. Houve diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos (FIGURA 11C) nos descendentes masculinos dos grupos 7,5 e 75 mg/kg/dia, bem

como uma redução do colesterol plasmático (FIGURA 11D) no grupo 75 mg/kg/dia. Já em relação aos dados das descendentes fêmeas, houve diminuição significativa na concentração de glicose plasmática do grupo 75 mg/kg/dia (FIGURA 12A), e também diminuição nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (FIGURA 12C) e colesterol (FIGURA 12D) do grupo exposto a 7,5 mg/kg/dia de DEHP. As concentrações plasmáticas de insulina não diferiram significativamente entre os grupos em nenhum dos sexos.

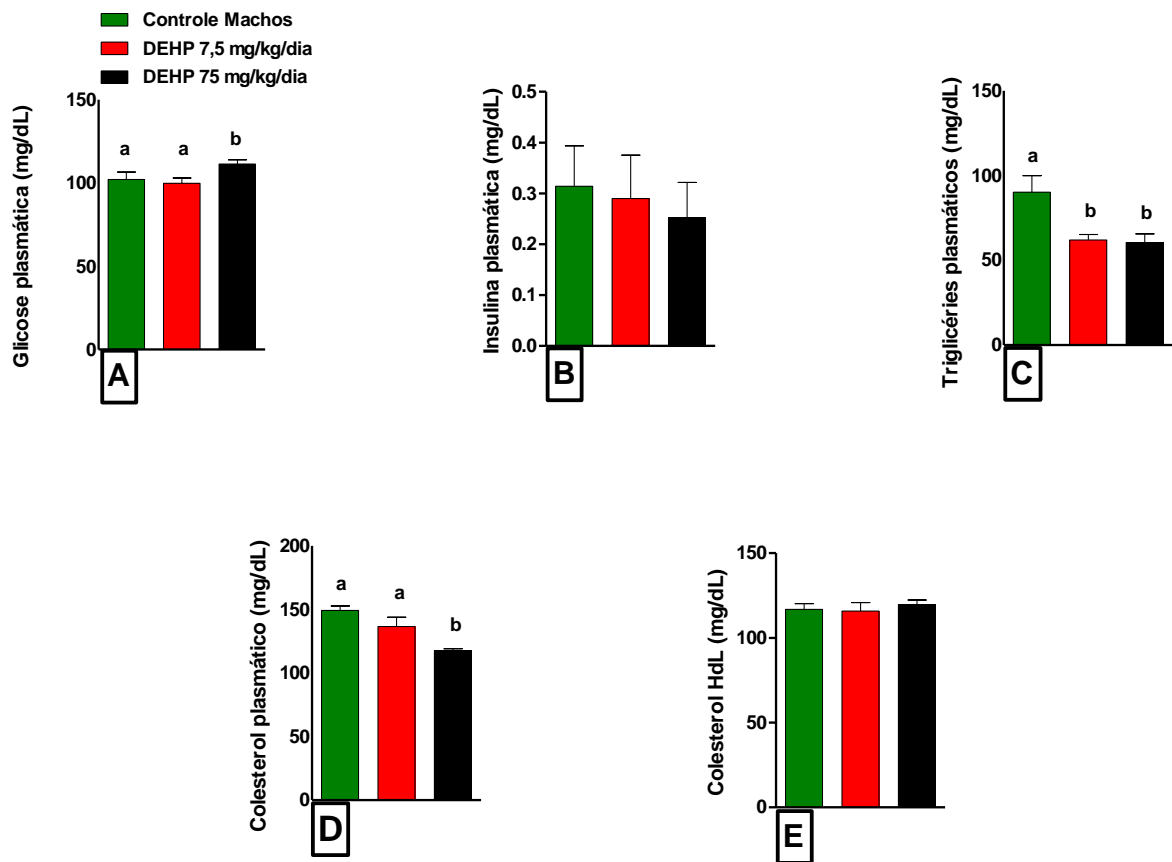


FIGURA 11. Concentrações plasmáticas de glicose (A), insulina (B), triglicerídeos (C), colesterol total (D) e HDL (E) nos descendentes machos. As amostras foram coletadas após um jejum de 12 horas, aos 91 dias de vida. (n= 12-13 ratos/grupo). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni).

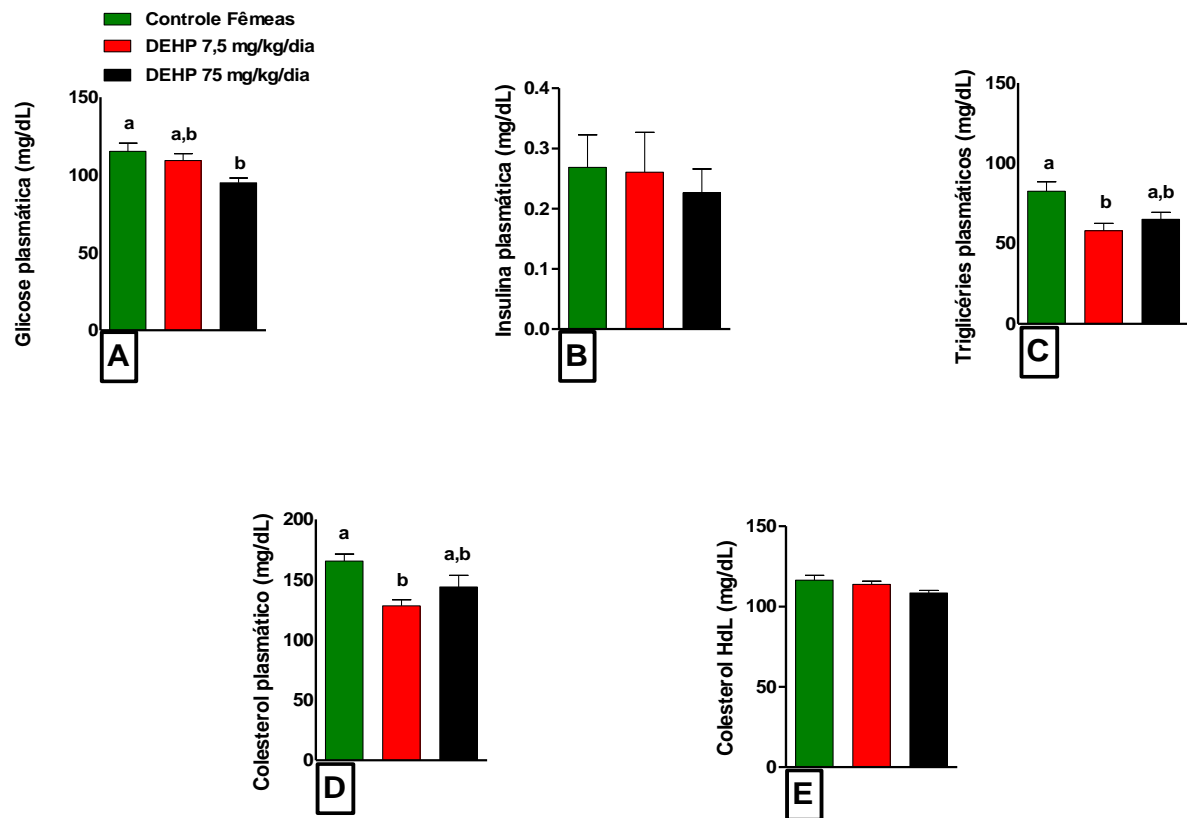


FIGURA 12. Concentrações plasmáticas de glicose (A), insulina (B), triglicerídeos (C), colesterol total (D) e HDL (E) nas descendentes fêmeas. As amostras foram coletadas após um jejum de 12 horas, aos 91 dias de vida. (n= 11-12 ratas/grupo). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni)

#### 4.1.2.5 Teste de tolerância à insulina

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa no teste de tolerância à insulina entre os grupos experimentais nos descendentes machos e fêmeas avaliados nos dias 22 e 60 de vida (FIGURAS 13 e 14).

Contudo, os descendentes machos das progenitoras tratadas com 75 mg/kg/dia, analisados aos 90 dias de vida, apresentaram diminuição significativa na taxa de decaimento da glicose ( $K_{it}$ ), parâmetro calculado pelo coeficiente angular (*slope*) da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da concentração de glicose sanguínea versus o tempo, e expressa em porcentagem por minuto.

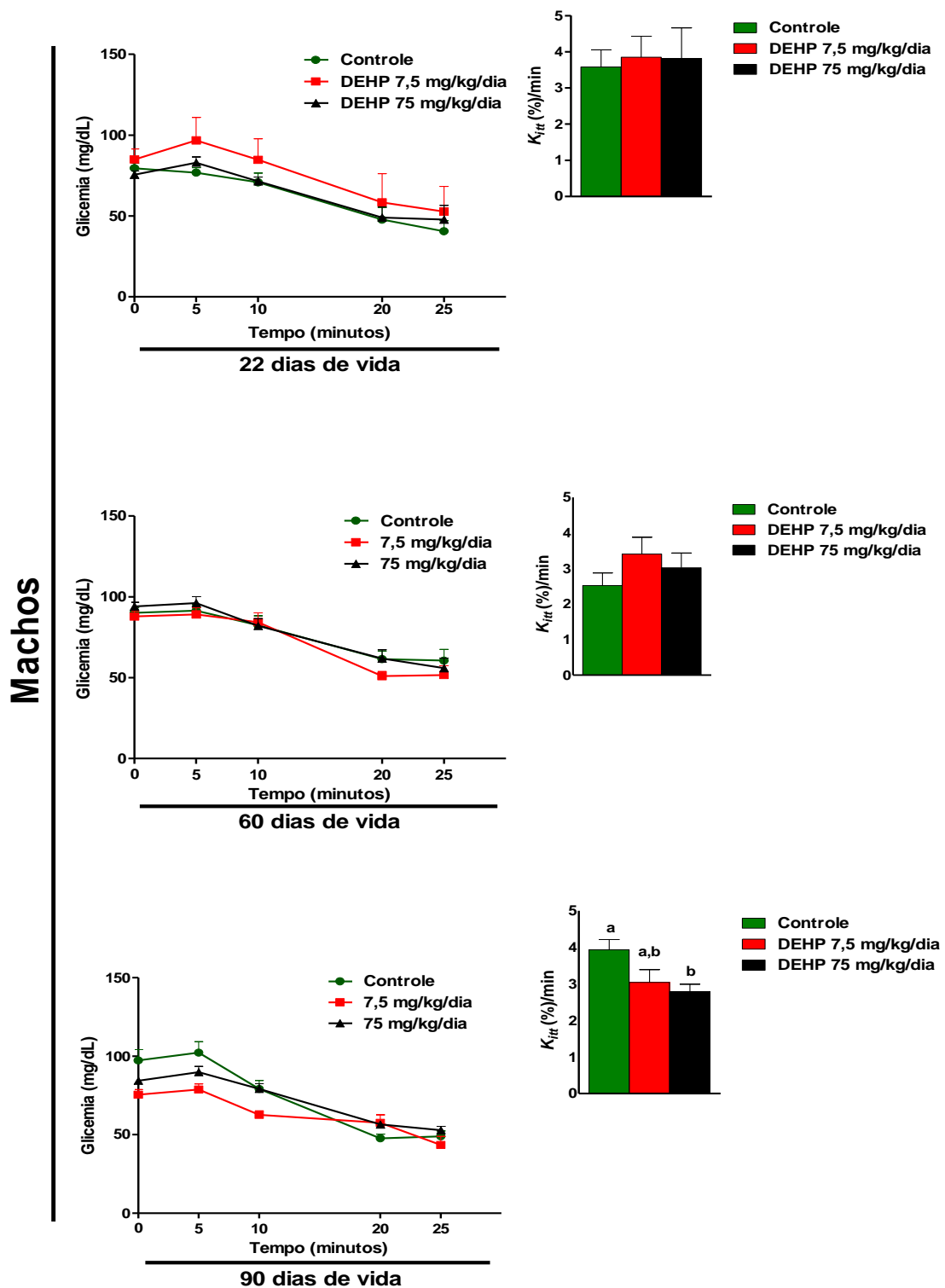


FIGURA 13. Teste de tolerância à insulina em ratos machos expostos ao plastificante DEHP durante o período de lactação. As amostras foram coletadas aos 22, 60 e 90 dias de vida. Os gráficos representam as concentrações de glicose em diferentes tempos após a administração de insulina e a taxa de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ). (n=10 ratos/grupo). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni)

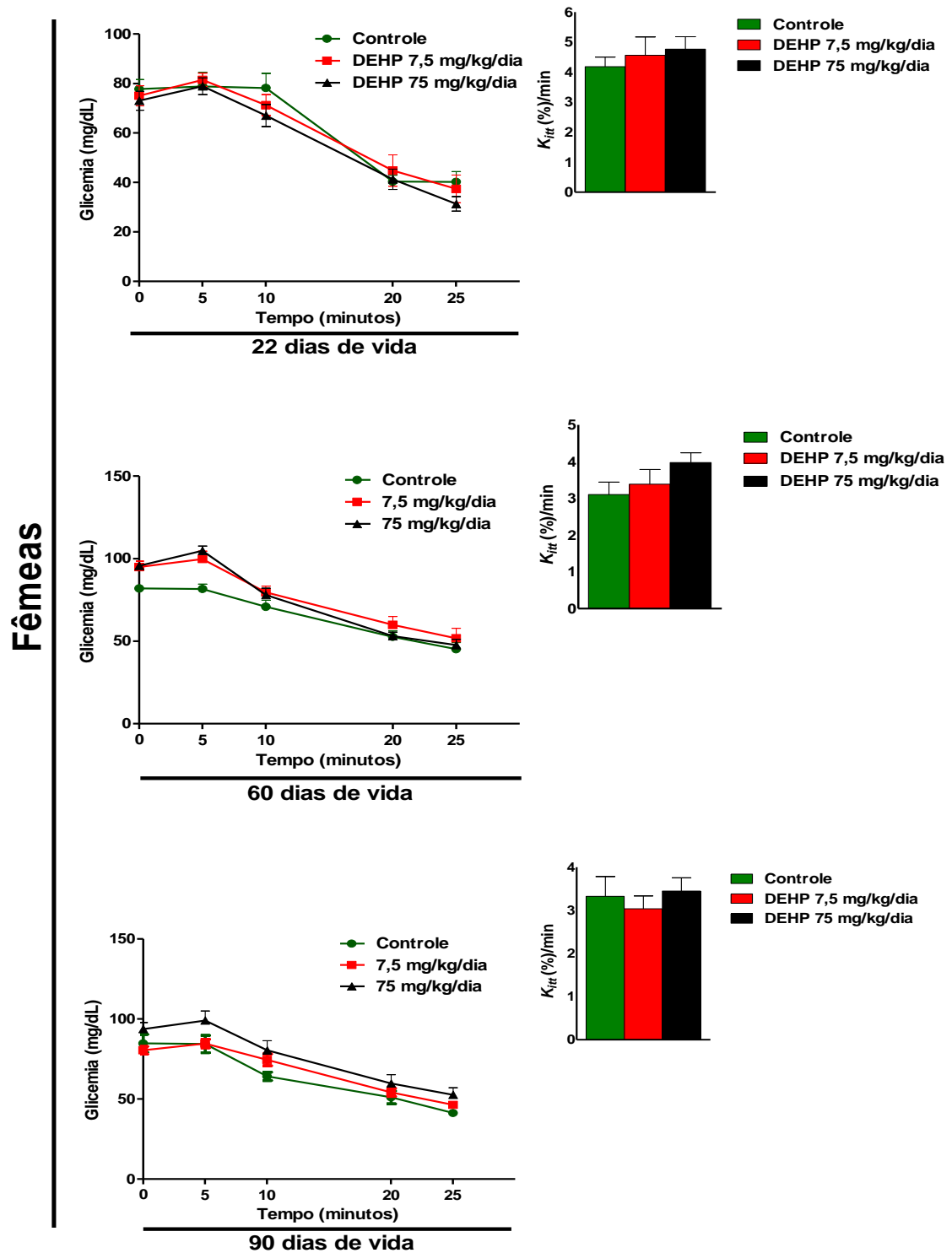


FIGURA 14. Teste de tolerância à insulina em ratas expostas ao plastificante DEHP durante o período de lactação. As amostras foram coletadas aos 22, 60 e 90 dias de vida. Os gráficos representam as concentrações de glicose em diferentes tempos após a administração de insulina e a taxa de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ). (n=10 ratos/grupo).

#### 4.1.2.6 Separação prepucial e abertura do canal vaginal

A TABELA 5 representa a média de idade em que ocorreu a separação prepucial e a abertura do canal vaginal, bem como a média do peso corporal correspondente à idade em que esses parâmetros foram atingidos. Os dados indicam que não houve diferenças significativas nos períodos de abertura vaginal e separação prepucial ou em relação ao peso dos animais.

TABELA 5. SEPARAÇÃO PREPUCIAL (MACHOS), ABERTURA DO CANAL VAGINAL (FÊMEAS) E PESO CORPORAL DOS DESCENDENTES QUE FORAM EXPOSTOS AO DEHP DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO.

Parâmetro	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Separação Prepucial (dia)	44,81±2,434	45,41±2,212	44,45±3,017
Peso (g)	152,4±14,27	156,4±12,52	153,3±18,73
Abertura Canal Vaginal (dia)	36,31±2,379	38,60±4,770	36,06±2,772
Peso (g)	93,47±11,99	102,5±23,58	100,1±16,53

Os dados representam a média ± desvio padrão. (n= 19-21 ratos/grupo e n= 17-19 ratas/grupo).

#### 4.1.2.7 Secreção de insulina

As FIGURAS 15 e 16 mostram os resultados da secreção de insulina induzida por diferentes concentrações de glicose (5,6mM; 8,3mM e 16,7mM) em ilhotas pancreáticas isoladas de descendentes machos e fêmeas expostos ao plastificante DEHP durante o período de lactação. Não houve diferença significativa na secreção de insulina estimulada por glicose 5,6mM quando comparada à secreção das ilhotas dos animais controle em ambos os sexos. No entanto, houve diminuição de 50% e 60% na secreção de insulina nos grupos experimentais 75 mg/kg/dia (machos e fêmeas respectivamente) estimulados com 8,3mM de glicose quando comparados com os grupos controle e 7,5 mg/kg/dia. Ainda, em relação aos descendentes machos, houve significativa diminuição de 58% na secreção de insulina, após estimulação por 16,7mM de glicose no grupo 75 mg/kg/dia, quando comparados ao



controle. Nos descendentes do sexo feminino, no entanto, houve aumento de 172% na secreção de insulina no grupo 7,5 mg/kg, quando as ilhotas foram estimuladas com glicose 16,7mM.

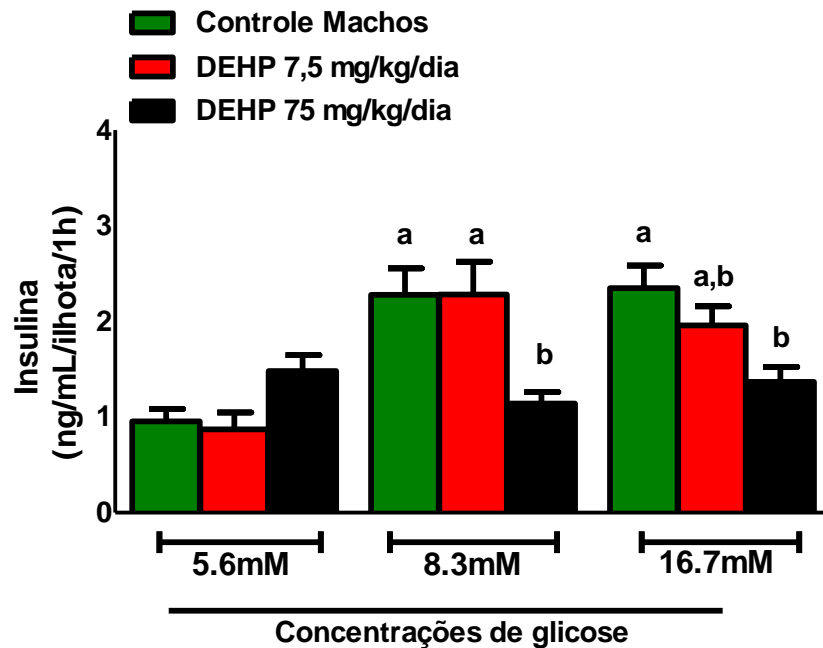


FIGURA 15. Efeito na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos machos adultos expostos ao DEHP durante o período de lactação. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão. (n= pool 4-5 ratas/grupo). Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ . As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni)

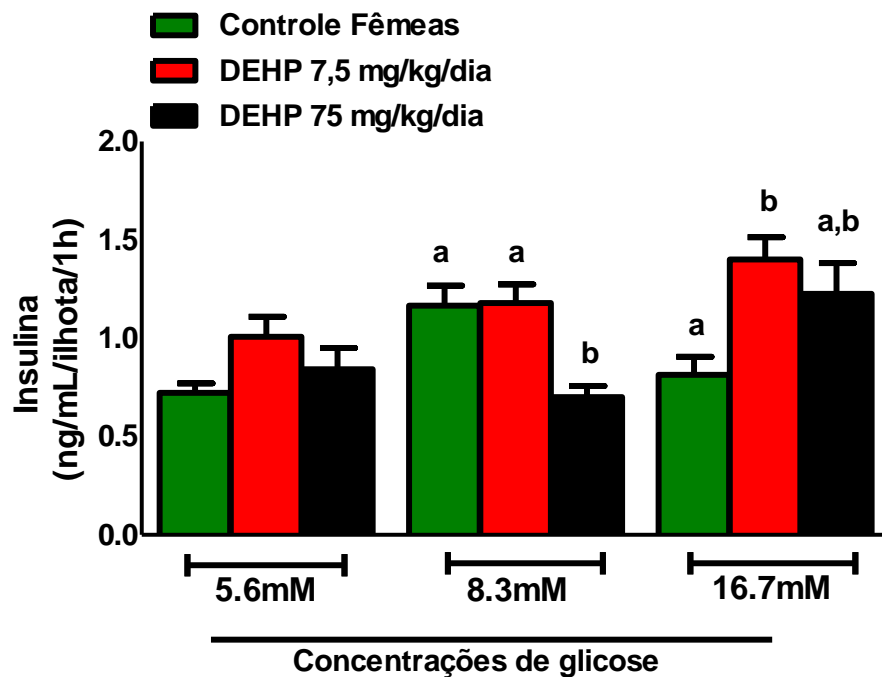


FIGURA 16. Efeito na secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratas fêmeas adultas expostas ao DEHP durante o período de lactação. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão. (n= pool 4-5 ratas/grupo). Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ . As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni).

#### 4.1.2.8 Concentração de Metabólitos Fecais de Corticosterona

Como demonstrado na FIGURA 17, o monitoramento das concentrações de metabólitos fecais de corticosterona, realizado do desmame até os 88 dias de vida, não diferiu entre os grupos experimentais, tanto nos descendentes masculinos quanto nos femininos.

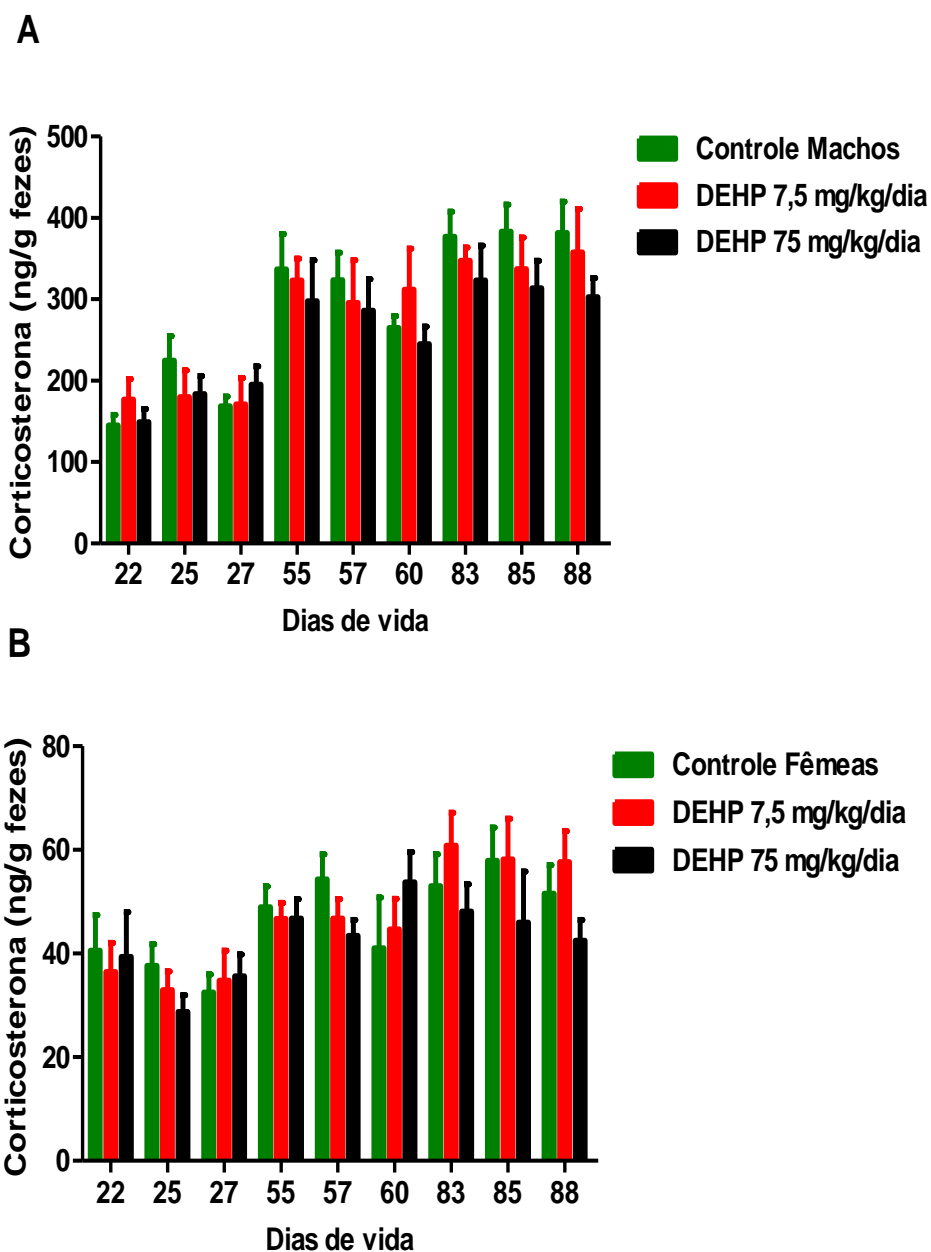


FIGURA 17. Concentrações de metabólitos fecais de corticosteroides em descendentes machos e fêmeas expostos ao plastificante DEHP via leite materno. (ng/g fezes; média  $\pm$  erro padrão da média) (n= pool de 5 animais/caixa).

#### 4.1.2.9 Concentração de Metabólitos Fecais de Testosterona

De maneira geral, a exposição ao plastificante DEHP nos descendentes machos via leite materno não alterou as concentrações de metabólitos fecais de testosterona nos grupos experimentais monitorados dos 22 aos 88 dias de vida.

Entretanto, houve um aumento significativo nos metabólitos fecais aos 88 dias de vida no grupo 7,5 mg/kg/dia em relação aos demais grupos. (FIGURA 18).

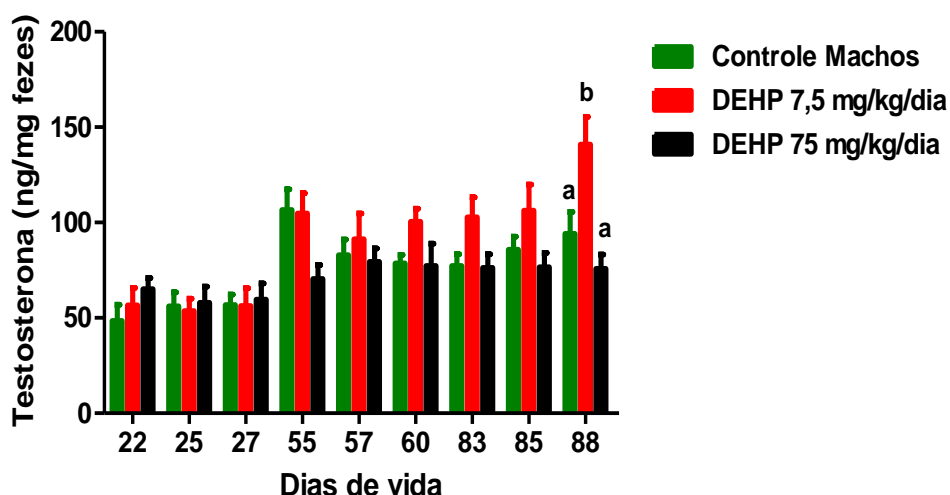


FIGURA 18. Concentrações de metabólitos fecais de testosterona em descendentes machos expostos ao plastificante DEHP via leite materno. (ng/g fezes; média  $\pm$  erro padrão da média) (n= pool de 5 animais/caixa). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni).

## 4.2 EXPERIMENTO 2

### 4.2.1 Dados ratos no período pubertal

#### 4.2.1.1 Ganho de peso

O peso corporal dos animais, monitorado ao longo do tratamento do 22º ao 52º dia de vida, não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (FIGURA 19).

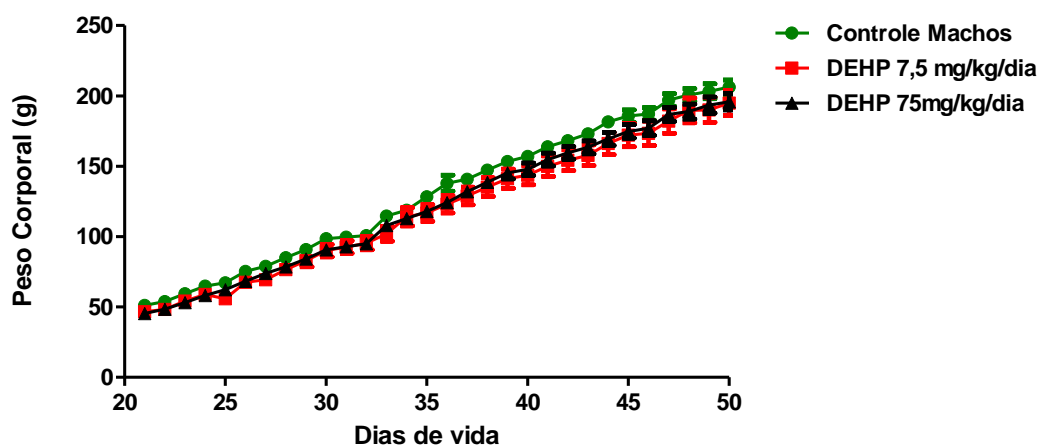


FIGURA 19. Peso corporal de ratos púberes tratados diariamente do 22º ao 52º dia de vida com óleo de milho (veículo controle) ou com o plastificante DEHP (n = n= 13 ratos/grupo Controle; n= 14 ratos/grupo 7,5 mg/kg/dia e n=15 ratos/grupo 75 mg/kg/dia.).

#### 4.2.1.2 Peso de órgãos e tecidos

A TABELA 6 mostra os dados de pesos de órgãos e tecidos retirados dos animais no período de puberdade, após exposição diária ao plastificante DEHP entre os dias 22 e 52 de idade. Os dados indicam que houve uma diminuição significativa no peso da vesícula seminal do grupo 7,5 mg/kg/dia em relação ao controle. Não houve diferença significativa nos demais órgãos e depósitos de gorduras entre os diferentes grupos experimentais.

TABELA 6. PESO ABSOLUTO (G) E RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOS ANIMAIS NO PERÍODO DA PUBERDADE EXPOSTOS AO DEHP DIARIAMENTE.

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Peso corporal (g)	139,4±54,35	128,1±51,16	130,3±51,79
Retroperitoneal (g)	0,852±0,228	0,872±0,551	0,605±0,298
(%)	0,390 0,088	0,414±0,245	0,287±0,125
Perigonadal (g)	1,077±0,264	1,124±0,414	0,992±0,226
(%)	0,500 0,128	0,543±0,170	0,484±0,098
Inguinal (g)	0,459±0,164	0,511±0,265	0,374±0,128
(%)	0,212±0,072	0,244±0,108	0,183±0,063
Fígado (g)	8,077±1,364	7,431±1,322	8,046±1,019
(%)	3,709±0,364	3,683±0,253	3,929±0,247
Pâncreas (g)	0,879±0,237	0,816±0,229	0,712±0,123
(%)	0,406±0,106	0,397±0,077	0,351±0,068
Rim (g)	0,800±0,069	0,749±0,126	0,776±0,107
(%)	0,371±0,018	0,371±0,019	0,379±0,023
Tireóide (g)	0,011±0,003	0,011±0,003	0,012±0,003
(%)	0,602±0,066	0,556±0,121	0,605±0,066
Testículos (g)	1,296±0,092	1,121±0,304	1,229±0,103
(%)	0,072±0,012	0,069±0,009	0,070±0,011
Epidídimos (g)	0,155±0,019	0,139±0,031	0,143±0,020
(%)	0,045±0,018	0,034±0,012	0,046±0,012
Próstata (g)	0,096±0,031	0,070±0,025	0,095±0,028
(%)	0,182±0,019	0,157±0,033	0,172±0,022
Vesícula Seminal (g)	0,169±0,028 <sup>a</sup>	0,134±0,043 <sup>b</sup>	0,163±0,028
(%)	0,078±0,011	0,066±0,016	0,080±0,012
Musculo lev. Ânus (g)	0,395±0,058	0,324±0,101	0,351±0,055
(%)	0,005±0,001	0,006±0,002	0,006±0,001

Os dados representam a média ± desvio padrão. Os animais foram eutanasiados aos 53 dias de vida e os órgãos e tecidos foram coletados logo após o sacrifício. Peso relativo = (peso órgão/peso corporal) x 100. (n= 13 ratos/grupo Controle; n= 14 ratos/grupo 7,5 mg/kg/dia e n=15 ratos/grupo 75 mg/kg/dia). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (p< 0,05, ANOVA/Bonferroni)

#### 4.2.1.3 Parâmetros bioquímicos

As concentrações séricas de glicose foram significativamente maiores no grupo 75 mg/kg/dia em relação ao grupo controle. No entanto, em relação às concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL não houve diferença significativa entre os grupos (TABELA 7).

TABELA 7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS MACHOS PÚBERES TRATADOS COM O PLASTIFICANTE DEHP

Parâmetros	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Glicose Basal (mg/dL)	81,25±8,080 <sup>a</sup>	86,00±10,40 <sup>a</sup>	105,5±10,65 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	92,80±9,630	92,16±14,45	88,38± 9,229
Colesterol Total (mg/dL)	90,31±31,43	84,91±6,891	79,94±8,080
Colesterol HDL (mg/dL)	55,94±3,506	57,77±3,376	57,45± 3,324

Os dados representam a média ± desvio padrão. Os animais foram tratados com DEHP do 22º ao 52º dia de vida e as amostras de soro foram coletadas 1 dia após o final do tratamento em jejum de 12 horas. (n= n= 13 ratos/grupo Controle; n= 14 ratos/grupo 7,5 mg/kg/dia e n=15 ratos/grupo 75 mg/kg/dia).).

#### 4.2.1.4 Teste de tolerância à insulina

Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina aos 50 dias de vida, três dias antecedentes à eutanásia. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. (FIGURA 20).

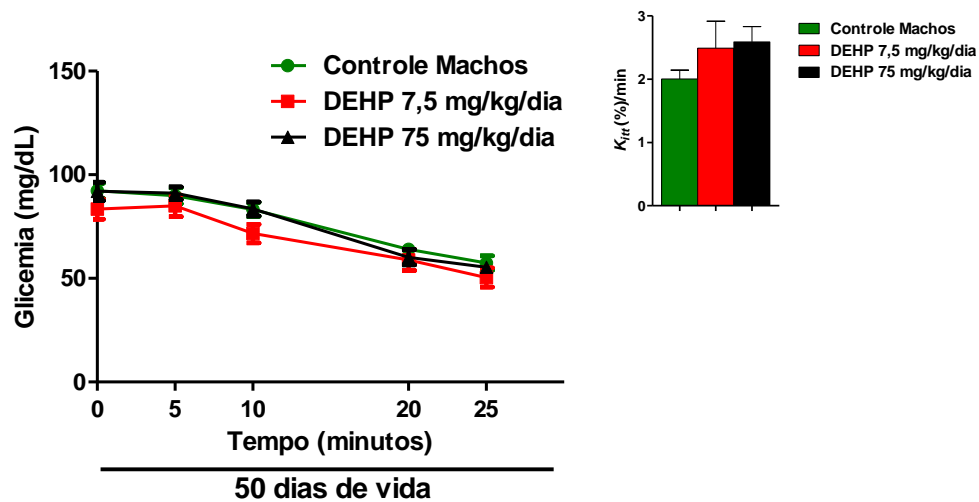


FIGURA 20. Teste de tolerância à insulina em ratos machos tratados diariamente com DEHP a partir do 22º dia pós-natal. As amostras foram coletadas aos 50 dias de vida. O gráfico representa as concentrações de glicose em diferentes tempos após a administração de insulina e a taxa de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ). (n= n= 13 ratos/grupo Controle; n= 14 ratos/grupo 7,5 mg/kg/dia e n=15 ratos/grupo 75 mg/kg/dia).).

#### 4.2.1.5 Separação Prepucial

A TABELA 8 apresenta a idade média para a separação prepucial em ratos expostos diariamente ao DEHP a partir do 22º dia de vida, bem como o peso corporal dos animais na idade correspondente à separação prepucial. Os dados indicam que não houve diferença significativa na idade média de separação prepucial dos animais tratados em relação aos controles, assim como no peso corporal.



TABELA 8. SEPARAÇÃO DE PREPUCIAL E PESO CORPORAL (G) DOS ANIMAIS QUE FORAM EXPOSTOS AO DEHP DURANTE O PERÍODO DE PUBERDADE

Parâmetro	DEHP (mg/kg/dia)		
	0	7,5	75
Separação Prepucial	43,64±1,008	43,69±1,494	44,13±1,598
Peso (g)	178,4±18,03	168,6±18,75	169,9±21,87

Os dados representam a média ± desvio padrão. (n= 13 ratos/grupo Controle; n= 14 ratos/grupo 7,5 mg/kg/dia e n=15 ratos/grupo 75 mg/kg/dia).

#### 4.2.1.6 Concentração de metabólitos fecais de corticosterona

Em relação ao monitoramento a longo prazo da excreção de metabólitos fecais de corticosterona, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (FIGURA 21).

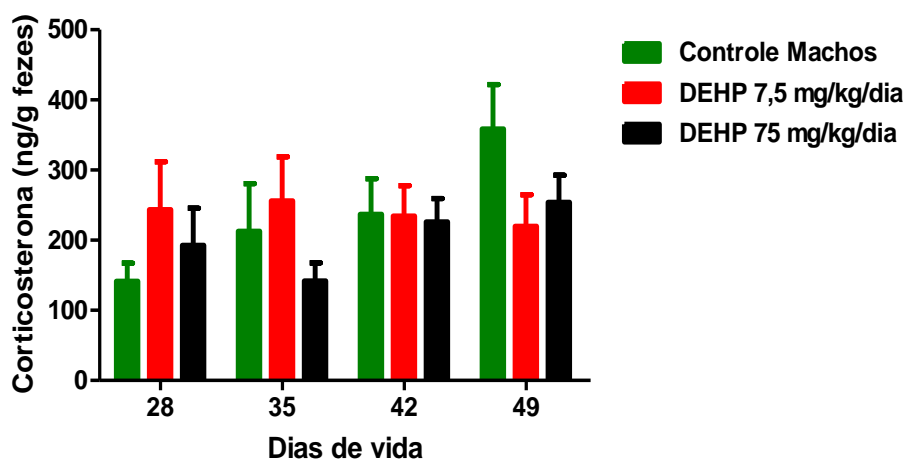


FIGURA 21. Concentrações de metabólitos fecais de corticosteroides em ratos machos púberes expostos diariamente ao plastificante DEHP a partir do 22º dia pós-natal (ng/g fezes; média± erro padrão da média) (n= 15 animais/caixa).

#### 4.2.1.7 Concentração de metabólitos fecais de testosterona

A FIGURA 22 representa o monitoramento da excreção de metabólitos fecais de testosterona em ratos machos tratados diariamente com veículo ou DEHP a partir do dia 22 de vida. Houve uma diminuição na concentração de metabólitos fecais de testosterona no grupo 7,5 mg/kg/dia em relação ao controle, porém apenas no dia 49 pós-natal.

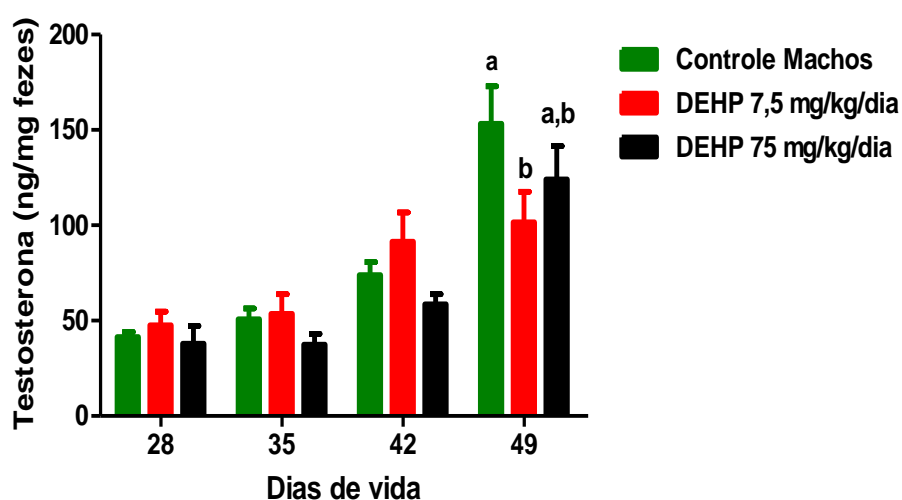


FIGURA 22. Concentrações de metabólitos fecais de testosterona em ratos machos no período pubertal tratados diariamente como plastificante DEHP a partir do 22º dia pós-natal (ng/g fezes; média  $\pm$  erro padrão da média) (n= pool de 5 animais/caixa). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , ANOVA/Bonferroni)

## 5. DISCUSSÃO

Os ftalatos apresentam uma variedade de efeitos que mudam de acordo com diferentes fatores, tais como a espécie animal, a dose empregada, a faixa etária e a via de exposição. Embora muitos dos riscos associados à exposição aos ftalatos já sejam relativamente bem conhecidos, os dados a respeito dos efeitos metabólicos da exposição ao DEHP, principal ftalato usado como plastificante em uma ampla variedade de produtos industrializados, são ainda contraditórios e restritos.

É sabido que a exposição a produtos químicos em períodos críticos do desenvolvimento pode favorecer a instalação de doenças crônicas, mesmo que manifestadas somente na vida adulta, predispondo descendentes a distúrbios metabólicos. (ALONSO-MAGDALENA et al., 2010 e HECTORS et al., 2011). Além disso, é importante destacar que recém-nascidos e crianças podem apresentar maior exposição a determinadas substâncias químicas, como o DEHP, pelo contato com brinquedos, mordedores, poeira doméstica, entre outros, mas também pela maior ingestão de água e alimentos por quilograma de peso corporal. Nesse contexto, destacam-se ainda, as diferenças nas capacidades metabólicas entre adultos e crianças. Para os diésteres de ftalato, sabe-se que os principais agentes tóxicos são os metabólitos monoésteres primários, formados a partir da hidrólise dos compostos parentais pela ação de enzimas lipases presentes principalmente no trato gastrointestinal. Em neonatos, essas enzimas são amplamente ativas na mucosa gástrica e podem ser responsáveis por ampla conversão do DEHP no seu monoéster ativo, o mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP). Além disso, organismos imaturos apresentam menor capacidade de glicuronidação e, conseqüentemente, menor eliminação de metabólitos de ftalatos e outros xenobióticos (KAVLOCK et al., 2002).

Durante o período pós-natal precoce, a exposição materna a substâncias tóxicas também pode levar a mudanças no desempenho lactacional e conseqüentemente afetar o desenvolvimento dos descendentes. Muitos fármacos lipossolúveis e produtos químicos têm sido encontrados no leite materno, como bifenilas policloradas, pesticidas organoclorados e ftalatos (YAKUSHIJI et al., 1979;

JENSEN et al, 1983; LATINI et al., 2009). O DEHP é um composto altamente solúvel em lipídios, o que permite seu fácil transporte através da barreira placentária, bem como a sua passagem para o leite materno (LATINI et al., 2009; KAVLOCK et al., 2002).

Em um trabalho realizado por Dostal e colaboradores (1987), ratas lactantes expostas a 2000 mg/kg/dia de DEHP apresentaram em média 216 µg de DEHP e 25 µg de MEHP, seu metabólito ativo, no leite. Adicionalmente, esses dados são consistentes com um trabalho realizado por Parmar et al, (1985), onde o tratamento com DEHP casou alterações na atividade de enzimas hepáticas peroxissomais em ratos filhotes com 21 dias de vida, sugerindo a transferência de DEHP através do leite materno. Vários são os fatores que contribuem para a extração eficiente do DEHP do plasma para o leite, incluindo a sua lipossolubilidade e capacidade de associação a lipoproteínas plasmáticas (ALBRO e CORBETT., 1978), que constituem uma importante fonte de lipídios no leite (SCOW et al., 1972). Assim, a lactação tem sido considerada uma fase crítica para a exposição ao DEHP.

Em nosso estudo, sugerimos que a exposição ao DEHP durante o período crítico de lactação pode prejudicar o estado metabólico dos descendentes expostos via leite materno, particularmente em relação à homeostase glicêmica. Adicionalmente a esse experimento avaliamos a exposição ao DEHP em ratos machos no período da puberdade e as possíveis alterações metabólicas induzidas nessa janela crítica de desenvolvimento. Além disso, as progenitoras expostas diretamente durante o período de lactação também foram avaliadas a fim de detectar possíveis indícios de toxicidade geral, como modificações no ganho de peso corporal, ou mesmo alterações metabólicas que pudessem interferir nos resultados obtidos para os descendentes. Tal avaliação é importante, uma vez que alterações induzidas nas progenitoras durante a lactação (ex.: toxicidade materna) podem ocasionar efeitos indiretos nos filhotes, dificultando o reconhecimento dos efeitos diretos do xenobiótico na progênie. No estudo puberal, foram escolhidos ratos machos, pois os efeitos mais evidentes sobre a função metabólica no estudo de exposição lactacional foram observados nos descendentes masculinos.

A administração de DEHP em duas diferentes doses (7,5 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia) não resultou em alterações no comportamento alimentar, tais como hipo ou hiperfagia, seja no período de amamentação (progenitoras e filhotes) ou após o desmame. Também não foram observadas alterações no peso corporal e de órgãos

das progenitoras, indicando ausência de toxicidade sistêmica materna. No período pós-desmame, não foram observadas alterações no peso corporal dos descendentes do sexo masculino, embora nas fêmeas expostas a maior dose (75 mg/kg/dia) tenha sido detectado um aumento na área sobre a curva de peso corporal em relação aos demais grupos experimentais. Porém, ao avaliar o peso de depósitos de gordura isolados e órgãos como fígado, rins e adrenais, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, tanto em machos quanto em fêmeas. A razão para o aumento da área sobre a curva de peso nos descendentes do sexo feminino expostos à maior dose de DEHP é desconhecida, mas sugere que machos e fêmeas podem responder de forma diferente a exposição lactacional ao DEHP. Com relação aos ratos machos tratados no período peripuberal também não foram observadas alterações no ganho de peso corporal ao longo dos 30 dias de exposição. De maneira geral, nossos resultados contrastam com os dados encontrados por Lin et al, (2011), que mostram que os descendentes de progenitoras expostas a 1,25 e 6,25 mg/kg/dia de DEHP durante a gestação e a lactação apresentaram redução do peso corporal em relação aos seus controles, bem como menor consumo alimentar no grupo 6,25 mg/kg/dia ao longo de todo experimento. É possível que essa resposta diferenciada se deva ao fato de que em nosso estudo os animais sofreram exposição somente no período de lactação, ou seja, em uma janela mais estreita de suscetibilidade ao DEHP.

Sabe-se que o período final da gestação é de fundamental importância, uma vez que muitos processos de amadurecimento do Sistema Nervoso Central (SNC) têm início nessa fase. Em roedores, a diferenciação dos núcleos hipotalâmicos segue até 20 dias após o nascimento, onde reguladores chave, como neuropeptídeos e receptores podem sofrer programações dependentes de fatores externos. Ou seja, o baixo peso ao nascer e uma diminuída ingestão alimentar, ou mesmo a exposição à desreguladores endócrinos, podem interferir em todo controle homeostático desses animais. (GROVE et al., 2005; TAYLOR e POSTON., 2007). Neurônios que compõem o Núcleo Arqueado (ARC) e os outros núcleos hipotalâmicos em ratos iniciam sua proliferação entre o 12<sup>o</sup> e o 17<sup>o</sup> dia de gestação. No entanto, as projeções neuronais tem seu pico de crescimento logo após o nascimento, sendo, portanto, dois os períodos críticos para a neurogênese hipotalâmica, o que implica

na possibilidade de interferências pré e pós-natais que podem ter consequências futuras no metabolismo e nutrição (BOURET, 2009).

A complexa interação entre moléculas sinalizadoras e produtos metabólicos produzidos por diferentes órgãos deve ser finamente orquestrada a fim de manter o equilíbrio metabólico. Se um elo desta ligação é interrompido por fatores genéticos, nutricionais, ambientais ou patológicos, todo o sistema pode ser perturbado, resultando em distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes e anorexia nervosa (BOSI et al., 2001; MIGLIARINI et al., 2011).

## **6.1 TRATAMENTO COM DEHP E EFEITOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDIOS E HORMÔNIOS ESTEROIDES**

No presente estudo, avaliamos as concentrações circulantes de triglicerídeos e colesterol total nas progenitoras logo após a eutanásia, e esses mesmos parâmetros, incluindo colesterol HDL, nos descendentes adultos, machos e fêmeas, expostos via leite materno e nos ratos machos expostos diretamente durante o período peripuberal. Os principais efeitos relacionados a esses parâmetros foram observados nos descendentes expostos durante a lactação, com reduções significativas nos níveis plasmáticos de triglicerídeos dos descendentes machos tratados com 7,5 e 75 mg/kg/dia e de colesterol no grupo 75 mg/kg/dia. Além disso, nos descendentes do sexo feminino foram observadas reduções nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol de ratas expostas a dose de 7,5 mg/kg/dia de DEHP em relação ao grupo controle.

Muitos experimentos têm mostrado redução na concentração de colesterol plasmático de animais tratados com DEHP. (OISHI et al., 1984; NAIR e KURUP et al., 1986; POON et al., 1997; MOCCHIUTTI e BERNAL, 1997). Nossos dados corroboram com um estudo publicado por Botelho et al., 2009, que reportou redução nos níveis séricos de colesterol em ratos tratados por 30 dias com 250 mg/kg/dia de DEHP. Adicionalmente, outro estudo, publicado por MA et al., 2006, constatou que ratas expostas ao DEHP por via inalatória nas doses de 5 e 25 mg/m<sup>3</sup> apresentaram redução na concentração sérica de colesterol. Bell (1982) também verificou esse efeito hipocolesterolêmico dos ftalatos ao submeter roedores a uma dieta contendo 0,5% e 1,0% de DEHP.

O colesterol modula uma série de funções de proteínas de membrana e está envolvido com vários processos de transporte e sinalização transmembrana (IKONEN et al., 2008). Isto significa que uma alteração no suprimento celular de colesterol pode estar implicado na diversidade de efeitos causados pela administração de DEHP, além de refletir na variabilidade de respostas observadas em animais de diferentes idades que são tratados com esse ftalato (AKINGBEMI et al., 2001; GE et al., 2007; CULTY et al., 2008).

A maioria desses estudos têm demonstrado uma ação bifásica do DEHP nos níveis de colesterol, onde a exposição a baixas doses tem mostrado efeito inibitório na sua síntese e doses mais elevadas têm induzido um aumento nas concentrações de colesterol. Estudos demonstram que o colesterol sérico foi significativamente reduzido em experimentos que utilizaram baixas doses de DEHP, e demonstram interferência com enzimas que participam da regulação do metabolismo lipídico (NAIR e KURUP, 1986; HOWART et al., 2001; MA et al., 2006; RUSYN et al., 2006; ITSUKI-YONEDA et al., 2007). Além disso, dados experimentais com ratos indicam que a exposição ao DEHP em curto prazo pode aumentar as concentrações de diferentes lipídios, incluindo o colesterol, enquanto em longo prazo observa-se inibição na síntese de lipídios hepáticos (XU et al., 2006; BELL et al., 1978). Várias pesquisas têm investigado os efeitos dos ésteres de ftalatos no metabolismo de lipídios e suas implicações no desenvolvimento sexual humano e de animais. Efeitos como a inibição da colesterologênese no fígado, testículos e adrenal de ratos que receberam DEHP na dieta foram demonstrados por Bell, 1982 e Xu, et al., 2007. O equilíbrio nas concentrações de colesterol é de fundamental importância, uma vez que este é precursor no processo de esteroidogênese e os hormônios esteróides sexuais são de extrema importância para o desenvolvimento fetal, assim como na puberdade. Toda a diferenciação masculina é criticamente dependente da secreção de testosterona pelas células de Leydig e o desequilíbrio na síntese e/ou sinalização de andrógenos afeta adversamente o desenvolvimento sexual pré e pós-natal. (GUNNARSSON et al., 2008).

O DEHP e alguns outros ftalatos são reconhecidamente tóxicos para o sistema reprodutivo masculino. Dentre os principais efeitos destaca-se a disfunção das células de Leydig e consequente deficiência de testosterona (MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010). A redução da disponibilidade de colesterol tem sido postulada como um dos componentes responsáveis pela supressão da síntese de

testosterona induzida pela administração de DEHP em ratos, embora outros passos subsequentes da esteroidogênese, incluindo a expressão e a atividade de diversas enzimas, também sejam inibidos pelo DEHP (BOTELHO et al., 2009; BARLOW et al., 2003). De acordo com Botelho et al. (2009), a potente inibição da esteroidogênese por ftalatos poderia explicar o acúmulo de lipídios nos tecidos e a ausência de efeitos sobre as concentrações circulantes de colesterol, após a exposição a altas doses de DEHP e outros ftalatos.

No presente estudo, o *status* androgênico de animais expostos ao plastificante DEHP foi avaliado por meio da quantificação de metabólitos fecais de androgênios, bem como pela avaliação da idade para a separação prepucial e pelo peso de órgãos e tecidos andrógeno-dependentes. A análise das concentrações de metabólitos de androgênios em amostras de fezes constitui uma metodologia de avaliação não-invasiva que permite a obtenção de um grande número de amostras ao longo do tempo, bem como a redução da interferência da variação circadiana, uma vez que as medidas são realizadas em amostras fecais de 24 horas. Em nosso estudo, os descendentes machos que foram expostos ao DEHP na dose de 7,5 mg/kg/dia, via leite materno, apresentaram um aumento na concentração de metabólitos fecais de testosterona aos 88 dias de vida. Nos demais dias avaliados, no entanto, não foram observadas alterações em relação ao grupo controle. O grupo tratado com a maior dose de DEHP, 75 mg/kg/dia, não apresentou nenhuma diferença em relação ao grupo controle. Em relação aos órgãos andrógeno-dependentes, também não foram observadas diferenças em nenhuma das doses testadas. Adicionalmente, quando acompanhamos o início da separação prepucial desses animais, considerado um marcador externo do início da puberdade, não houve atraso nem adiantamento dessa variável em relação ao controle. Da mesma forma, não foram observadas alterações na idade média para separação prepucial ou alteração em órgãos andrógeno-dependentes em ratos machos tratados diariamente do dia 22 ao 52 de vida. A única exceção foi a redução do peso absoluto da vesícula seminal no grupo tratado com 7,5 mg/kg/dia. Nesse mesmo grupo também foi observada uma redução nas concentrações de metabólitos fecais de androgênios, porém apenas no dia 49 pós-natal. Quando avaliados de maneira conjunta, esses dados indicam que as doses de DEHP testadas, 7,5 e 75 mg/kg/dia, não alteraram o *status* androgênico de ratos expostos durante a lactação, via leite materno, ou no período peripuberal, via administração oral direta. Os resultados



significativos observados em alguns parâmetros, como alterações pontuais nas concentrações de androgênios fecais e no peso da vesícula seminal, não foram consistentemente detectados nas diferentes doses e períodos testados e não são suportados por outras evidências. Além disso, outros resultados indicam que os efeitos anti-androgênicos do DEHP manifestam-se apenas em doses maiores do que aquelas testadas em nosso estudo (ANDRADE et al., 2006a, 2006b; BOTELHO et al., 2009).

Contudo, alguns estudos também indicam que os efeitos do DEHP e de outros ftalatos são amplamente dependentes das doses, períodos e duração da exposição. Akingbemi et al., (2004) demonstrou que ratos Long Evans tratados com 10 mg/kg/dia de DEHP do desmame até a idade adulta apresentam aumento crônico nas concentrações circulantes de testosterona e hormônio luteinizante (LH) com hiperplasia das células de Leydig e redução da capacidade esteroidogênica individual dessas células. É possível que os altos níveis de LH estimulem a biossíntese de andrógenos pelas células de Leydig, bem como a sua proliferação, mas em longo prazo causem a deterioração da capacidade funcional das células de Leydig (NEUMANN, 1991). Além disso, alguns dados indicam a possibilidade de efeitos bifásicos do DEHP sobre a síntese de testosterona, com estímulo em baixas doses e inibição em doses crescentes. (GE et al., 2007) expôs ratos Long Evans a 10, 500 e 750 mg/kg/dia de DEHP, via gavagem, do 21º ao 48º dia pós-natal e detectou aumento nas concentrações de testosterona e avanço na idade de separação prepucial em ratos tratados com a menor dose e efeitos opostos nos animais tratados com a maior dose desse ftalato. Esses efeitos estimulatórios do DEHP sobre a síntese de testosterona em “baixas doses” foram observados em outros estudos, incluindo em ratos expostos por via inalatória a doses equivalentes a doses orais de 10 mg/kg/dia (KURAHASHI et al., 2005) e em porcos tratados com 50 mg/kg/dia de DEHP via intramuscular, duas vezes por semana, no período da puberdade. (LJUNGVALL et al., 2005).

Contudo, como mencionado anteriormente, os dados de dosagens hormonais, peso de órgãos andrógeno-dependentes e parâmetros do desenvolvimento (ex.: separação prepucial), indicam ausência de efeitos androgênicos ou anti-androgênicos nas doses e períodos testados no presente estudo. De fato, dados prévios conduzidos em nosso laboratório indicam que os efeitos anti-androgênicos do DEHP ocorrem apenas após a exposição a doses maiores, acima de 150

mg/kg/dia para animais expostos *in utero* e acima de 250 mg/kg/dia em animais no período peripuberal (MARTINO-ANDRADE et al., 2009; BOTELHO et al., 2009). Adicionalmente, ao avaliarmos em longo prazo as concentrações de metabólitos fecais de corticosterona nas progenitoras tratadas durante a lactação e em seus descendentes, não houve nenhuma alteração no grupo de animais tratados quando comparados a seus controles. Da mesma forma, ratos tratados com DEHP diariamente por gavagem no período peribuberal também não demonstraram alterações nas concentrações de metabólitos fecais de corticosterona. Em conjunto, esses dados indicam ausência de efeitos do DEHP, nas doses e períodos de exposição testados, sobre a síntese de glicocorticóides pela glândula adrenal. Em um estudo prévio, Gayathri et al. (2004) demonstraram redução em concentrações séricas de corticóides de roedores expostos a cada dois dias a 75 mg/kg/dia DEHP durante duas semanas. No entanto, quando a exposição ao DEHP foi interrompida, essa redução foi revertida para níveis normais comparados aos controles. Adicionalmente, os autores não encontraram alterações nas concentrações de hormônio estimulante da tireóide (TSH), indicando que a hipófise anterior não foi afetada, e sugerindo que as alterações na glândula adrenal podem ser efeito direto do DEHP.

## **6.2 TRATAMENTO COM DEHP E HOMEOSTASE GLICÊMICA**

No presente estudo, os descendentes machos expostos ao plastificante DEHP durante lactação, via leite materno, demonstraram aumento da glicemia de jejum e redução da sensibilidade à insulina aos 90 dias de idade. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT) aos 22, 60 e 90 dias de idade nos descendentes masculinos e femininos expostos ao DEHP durante a lactação. Esse teste também foi conduzido nos ratos machos tratados diretamente por gavagem a partir do desmame, aos 50 dias de vida. Nos descendentes masculinos expostos via lactação à maior dose de DEHP, 75 mg/kg/dia, foi observado um aumento na concentração plasmática de glicose em jejum e uma redução na inclinação da curva de decaimento da glicemia após administração de insulina aos 90 dias de idade, indicando uma redução na sensibilidade insulínica desses animais. De maneira concordante com esses resultados, a administração

direta de DEHP em ratos machos por 30 dias a partir do desmame resultou em um aumento de cerca de 30% na glicemia em jejum no grupo 75 mg/kg/dia, quando comparado ao controle. Nesses animais, contudo, não foram observadas alterações no ITT. Por outro lado, em fêmeas expostas via lactação à menor dose de DEHP, 7,5 mg/kg/dia, foi observada uma redução na glicemia em jejum aos 90 dias de idade. No entanto, para as descendentes do sexo feminino não foram observadas diferenças significativas no ITT entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos períodos investigados (22, 60 e 90 dias de idade). Apesar dos efeitos observados nos filhotes, especialmente machos, as progenitoras não apresentaram alterações em parâmetros bioquímicos, incluindo glicemia em jejum. Esses resultados confirmam a hipótese de que muitos dos mecanismos de regulação do metabolismo são programados durante janelas críticas do desenvolvimento e que tais períodos representam maior vulnerabilidade para a indução de efeitos adversos decorrentes de fatores ambientais, como a exposição a desreguladores endócrinos. As alterações na homeostase glicêmica induzidas pelo DEHP, no entanto, não ocasionaram repercussões sobre o peso corporal ou os depósitos de gordura nos animais, parâmetros muitas vezes associados aos quadros de resistência insulínica.

Nos animais expostos ao DEHP durante a lactação também foram investigados os possíveis efeitos sobre a secreção insulínica em ilhotas isoladas do pâncreas. Para tanto, realizamos a incubação de ilhotas pancreáticas *in vitro* frente a três diferentes concentrações de glicose (5,6 mM; 8,3 mM e 16,7 mM). Em relação às respostas das ilhotas isoladas dos descendentes machos, houve considerável diminuição na secreção de insulina nos animais expostos a 75 mg/kg/dia de DEHP frente aos estímulos de 8,3 mM e 16,7 mM de glicose, quando comparados ao grupo controle. Essa diminuição da secreção de insulina também foi demonstrada nas descendentes fêmeas do grupo 75 mg/kg/dia ao estímulo de 8,3 mM de glicose. De maneira inversa, na concentração de 16,7 mM, ilhotas isoladas de ratas fêmeas expostas a 7,5 e 75 mg/kg/dia apresentaram uma hipersecreção de insulina, quando comparadas às ilhotas isoladas de ratas controle. A exposição ao DEHP prejudicou a homeostase glicêmica e o controle secretor de insulina nos descendentes machos e fêmeas juntamente com resistência à insulina, confirmada pelo ITT nos descendentes machos aos 90 dias de idade. A latência para a manifestação de alguns efeitos, como no teste de tolerância à insulina nos descendentes machos, que foi alterado apenas aos 90 dias de idade, indica que as modificações na

programação metabólica durante o desenvolvimento pode aumentar a suscetibilidade dos animais a alterações tardias. É possível que, apesar dos efeitos do DEHP no início da vida, as células beta possam secretar insulina de forma compensatória em animais jovens, atenuando os possíveis efeitos adversos da exposição lactacional. Contudo, tais compensações tornariam-se ineficientes com o avanço da idade, uma vez que a produção de novas células beta na vida adulta é baixa (VALTAT et al., 2011). A exposição durante períodos críticos como a lactação pode resultar em alterações na programação metabólica dos eixos e circuitos que regulam o metabolismo resultando em alterações permanentes que, no entanto, desencadeiam efeitos adversos que algumas vezes manifestam-se apenas tardiamente e que dependem também da interação com outros fatores endógenos e exógenos, como desafios metabólicos e senescência. (HECTORS, et al., 2011; FOWDEN e HILL., 2011). Ao avaliar descendentes de progenitoras expostas ao DEHP durante a gestação e a lactação, Lin et al. (2011) demonstraram hiperglicemia de jejum e diminuição na secreção *in vitro* de insulina de ilhotas pancreáticas de fêmeas, em ambos os tratamentos com DEHP utilizados (1,25 mg e 6,25 mg/kg/dia). Por outro lado, os descendentes machos apresentaram um aumento na secreção *in vitro* de insulina em ambas as doses de DEHP. Esses dados são opostos aos resultados reportados no nosso estudo e podem indicar que as diferenças sexo específicas dependem do período de exposição e das doses de DEHP utilizadas, uma vez que no estudo de Lin e colaboradores o período de exposição compreendeu toda a gestação e a lactação.

Uma das hipóteses postuladas por Lin et al., (2011), é que a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do pâncreas endócrino e na função das células beta esteja alterado em ratos que foram expostos ao DEHP. Nesse estudo, a expressão do gene Pdx-1 (*pancreatic and duodenal homeobox-1*), gene que regula o desenvolvimento precoce do pâncreas endócrino e a formação das ilhotas pancreáticas, foi diminuída nas proles expostas ao DEHP (machos e fêmeas). Brissova et al., (2002), demonstra que a redução no Pdx-1 prejudica a função mitocondrial, resultando em atenuada secreção de insulina e agenesia pancreática, o que poderia explicar, pelo menos parcialmente, os efeitos observados nos descendentes do sexo feminino. Além disso, efeitos adversos do DEHP sobre o receptor de insulina e taxa de oxidação da glicose em células do fígado (Linhagem Chang) tem sido reportados, sugerindo que a exposição ao DEHP pode ter uma

influencia negativa sobre a homeostase da glicose através de diferentes mecanismos. (RENGARAJAN et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado a associação da exposição ao DEHP e alterações nos níveis glicêmicos de jejum. Rajesh et al., (2013), demonstraram que a exposição a 100 mg/kg/dia de DEHP levou ao aumento da glicemia de jejum, e que houve diminuição na expressão do mRNA do receptor de insulina no tecido adiposo em roedores. O DEHP prejudicou a expressão de moléculas de sinalização da insulina e suas vias de fosforilação, e isso consequentemente levou a diminuição nos níveis do transportador da glicose GLUT4 na membrana plasmática e, portanto, contribuiu para a diminuição na captação de glicose para a célula. Gayathri et al., (2004), ao administrar 75 mg/kg de DEHP via intraperitoneal em ratas, encontrou aumento nas concentrações de glicose sanguínea. Mushtaq et al., 1980, mostrou que a administração de 5ml/kg de DEHP, via intraperitoneal, levou à intolerância a glicose, e diminuição na atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase no fígado, sugerindo que há diminuição da utilização de glicose em ratos tratados com DEHP. Martinelli et al., 2006 confirmou os mesmos resultados ao expor roedores a 2% de DEHP na dieta por 21 dias. Nesse estudo, o DEHP levou à redução dos níveis de Glicose-6-Fosfato, Frutose-6-Fosfato, piruvato e lactato hepático. A diminuição desses intermediários da glicólise sugerem uma menor captação de glicose e/ou uma redução da atividade da enzima glicoquinase.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para tentar esclarecer as possíveis alterações causadas pela exposição ao DEHP no metabolismo de lipídios e carboidratos. Sabe-se que os ésteres de ftalatos integram um grupo de compostos conhecidos por mediar seus efeitos por meio de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs), em especial os PPAR alfa, pertencentes à família de receptores nucleares que estão diretamente envolvidos com o metabolismo lipídico e glicêmico através da transcrição de genes envolvidos em vias de beta-oxidação e captação de ácidos graxos. (CASALS-CASALS et al., 2008; FEIGE et al., 2010).

Crescentes evidências epidemiológicas indicam que perturbações no ambiente intrauterino e pós-natal em períodos críticos do desenvolvimento aumentam o risco de desenvolvimento de várias doenças na vida adulta, cuja natureza varia com o tempo de exposição (DE BLASIO et al., 2007; ZAMBRANO et al., 2006; DE ROOIJ et al., 2006; GORSKI et al., 2006). Mudanças no ambiente

intrauterino e pós-natal promovem alterações na estrutura e função das ilhotas pancreáticas, que podem perdurar por toda vida, predispondo o animal à intolerância a glicose quando adulto. Em roedores, as ilhotas se desenvolvem relativamente no final da gestação e sofrem uma remodelação substancial imediatamente após o nascimento (FOWDEN E HILL, 2001). Ou seja, as alterações que ocorrem no início da vida podem resultar em células falhando com a idade, como é mostrado pela redução do teor de insulina no pâncreas em resposta aos estímulos de glicose de ratos adultos expostos ao DEHP na lactação.

De maneira geral, o presente estudo indica que a exposição ao plastificante DEHP pode alterar a homeostase glicêmica em ratos expostos durante a lactação e o período peripuberal, fases consideradas críticas para o desenvolvimento do pâncreas e sistemas de controle metabólico. Em particular, os efeitos induzidos pela exposição via lactação foram mais evidentes nos descendentes do sexo masculino expostos a maior dose de DEHP (75 mg/kg/dia), com aumento da glicemia em jejum e redução da sensibilidade à insulina na idade adulta. Além disso, a secreção de insulina também parece ter sido negativamente afetada, como demonstrado pela menor capacidade de resposta de ilhotas pancreáticas isoladas de animais expostos ao DEHP, quando desafiadas com concentrações crescentes de glicose *in vitro*. Em animais púberes, o tratamento oral com DEHP causou um aumento significativo da glicemia de jejum em animais expostos à maior dose, corroborando os resultados obtidos previamente com os descendentes masculinos expostos via leite materno. É importante destacar que os efeitos metabólicos descritos no presente estudo ocorrem em uma faixa de dose (75 mg/kg/dia) menor do que a necessária para desencadear outras ações clássicas do DEHP, como os efeitos anti-androgênicos. De fato, nossos dados indicam que as doses testadas, 7,5 e 75 mg/kg/dia, não afetaram o status androgênico dos animais, seja pela exposição via leite materno ou mesmo diretamente durante o desenvolvimento puberal. Conjuntamente esses dados indicam que a exposição ao DEHP em janelas críticas do desenvolvimento, particularmente na lactação e na puberdade, é capaz de induzir alterações na homeostase glicêmica e que tais efeitos ocorrem aparentemente em doses menores que aquelas necessárias para a indução de distúrbios reprodutivos.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais aqui descritas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As progenitoras expostas oralmente ao DEHP durante a lactação não foram afetadas pelo tratamento em relação ao ganho de peso, depósitos de gordura, peso de órgãos e parâmetros bioquímicos, indicando ausência de toxicidade materna e alterações metabólicas.
- Os descendentes do sexo masculino expostos durante a lactação apresentaram maior vulnerabilidade à exposição ao DEHP. Nesses animais foram detectadas alterações metabólicas, como mudanças na homeostase glicêmica na vida adulta, caracterizadas por aumento da glicemia de jejum, redução na sensibilidade à insulina e diminuição no teor de secreção de insulina;
- Os efeitos sobre as descendentes do sexo feminino não foram tão evidentes e para alguns parâmetros foram observadas respostas opostas às encontradas nos descendentes masculinos, indicando que a exposição ao DEHP possui, possivelmente, um padrão de resposta sexo-dependente.
- A exposição ao DEHP também ocasionou redução na concentração de colesterol e triglicerídeos nos descendentes machos e fêmeas expostos no período lactacional, corroborando resultados previamente publicados na literatura.
- Os ratos machos expostos no período peripuberal apresentaram alteração significativa na glicemia em jejum, corroborando os dados obtidos com os descendentes masculinos expostos durante a lactação. Não foram detectadas, no entanto, alterações na sensibilidade à insulina (ITT), concentrações de colesterol e triglicerídeos e peso corporal ou de órgãos.
- As doses de DEHP utilizadas nesse estudo não foram capazes de induzir alterações reprodutivas já caracterizadas consistentemente na literatura. O perfil androgênico de ratos machos expostos via lactação ou diretamente no período peripuberal, avaliado por meio das concentrações de androgênios fecais, peso de órgãos andrógeno-dependentes e idade para a separação prepucial, não foi alterado.

- As concentrações de metabólitos fecais de hormônios esteróides, corticosterona e androgênios, não revelaram alterações consistentes entre os diferentes grupos experimentais avaliados.

A administração de DEHP durante o período lactacional ou puberal de ratos altera a homeostase glicêmica, a sensibilidade à insulina e o controle secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. A magnitude destes efeitos foram dependentes do sexo, sendo mais marcantes em machos do que em fêmeas. Adicionalmente, em ambas as fases a administração de DEHP não afetou a maturação sexual ou a concentração de metabólitos fecais de esteróides sexuais em ratos machos e fêmeas expostos.



## 8. REFERÊNCIAS

AGARWAL A. K; GARG A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  gene in a patient with familial partial lipodystrophy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 408-11, 2002.

AKINGBEMI, B. T.; GE, R.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY, M. P. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 775-780, 2004.

AKINGBEMI, B. T.; YOUKER, R. T.; SOTTAS, C. M.; GE, R.; KATZ, E.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY, M. P. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 1252-1259, 2001.

ALBRO P. W. AND CORBETT J. T. Distribution of di- and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in human plasma. **Transfusion**, v. 8, p.750-755, 1978.

ALONSO-MAGDALENA P.; ROPERO A. B.; SORIANO S.; QUESADA I.; NADAL A. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? **Hormones**, v. 9, n. 2, p.118-126, 2010.

ANDERSON JOEL MARTINO-ANDRADE & IBRAHIM CHAHOUD. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Mol. Nutr. Food Res**. v. 54, p. 148–157, 2010.

ANDRADE A. J.; GRANDE S. W.; TALSNESS C. E.; GERICKE C.; GROTE K.; GOLOMBIEWSKI A.; STERNER-KOCK A.; CHAHOUD I. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Reproductive effects on adult male offspring rats. **Toxicology**, v. 228, p. 85–97, 2006.

ANDRADE A. J.; GRANDE S.W.; TALSNESS C.E.; GROTE K.; GOLOMBIEWSKI A.; STERNER-KOCK A.; CHAHOUD I. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, p. 64–74, 2006.

AUHAREK, A. S. Prenatal Plus Postnatal Exposure to Di(n-Butyl) Phthalate and/or Flutamide Markedly Reduces Final Sertoli Cell Number in the Rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2868–2875, 2010.

BARLOW, N. J.; PHILLIPS, S. L.; WALLACE, D. G.; SAR, M.; GAIDO, K. W.; FOSTER, P. M. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. **Toxicological Sciences**, v. 73, p. 431-441, 2003.

BEAMER, B. A.; YEN C.J.; ANDERSEN R.E.; MULLER D.; ELAHI D.; CHESKIN L.J.; ANDRES R.; ROTH J.; SHULDINER A.R. Association of the Pro12Ala variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ 2 gene with obesity in two Caucasian populations. **Diabetes**, v. 47, p.1806-8, 1998.

BELL, F. P., PATT, C. S., BRUNDAGE, B., GILLIES, P. J., AND PHILLIPS, W. A. Studies on lipid biosynthesis and cholesterol content of liver and serum lipoproteins in rats fed various phthalate esters. **Lipid**, v. 13, p. 66–74, 1978.

BELL, F.P. Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. **Environmental Health Perspectives**, v. 45, p. 41-50, 1982.

BERSON S; YALOW R. Radioimmunoassay of ACTH in Plasma. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 47, n. 12, p. 2725-2751, 1968.

BILA M. D; DEZOTTI M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: efeitos e consequência. **Quim. Nova**. v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BIRKETT J. W; LESTER J. N.; Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge. Treatment Process, 1st ed., **Lewis Publishers**, 2003.

BOSI E.; MINELLI R.; BAZZIGALUPPI E.; SALVI M., Fulminant autoimmune Type 1 diabetes during interferon-alpha therapy: a case of Th1-mediated disease?, **Diabet Med**, v. 18, p. 329–332, 2001.

BOTELHO G.; GOLIN M.; BUFALO A. C.; MORAIS R. N.; DALSENTER P. R.; MARTINO-ANDRADE A. J. Reproductive Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate in Immature Male Rats and Its Relation to Cholesterol, Testosterone, and Thyroxin Levels. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 57 p. 777–784, 2009.

BOURET, S. G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**,. v. 48, n 1, p. 31-8, 2009.

BRISSOVA M.; SHIOTA M.; NICHOLSON W.E.; GANNON M.; KNOBEL S.M.; PISTON D.W.; WRIGHT C.V.; POWERS A.C. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 277, p. 11225–11232, 2002.

BROWN, J. et al. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. **Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia**, 2004.

CASALS-CASALS, C; DESVERGNE, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. **Rev. Physiol.** v. 73, p. 135-162, 2011.

CASALS-CASAS C.; FEIGE J. N.; DESVERGNE B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. **International Journal of Obesity**. v. 32, p. 53– 61, 2008.

COLBORN, T. *et al.* Health Perspect, v. 101, p. 378, 1993.

CULTY, M.; THUILLIER, R.; LI, W.; WANG, Y.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; BENJAMIN, C. G.; TRIANTAFILOU, K. M.; ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. In Utero Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1018-1028, 2008.

DALSENTER, P. R.; FAQI A.S.; WEBB J.; MERKER H.J.; CHAHOUD I. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Exp Toxicol**, v. 16, n. 3, p.146-53, 1997.

DE BLASIO M. J.; DODIC M.; JEFFERIES A. J.; MORITZ K.M.; WINTOUR E.M.; OWENS J.A.; Maternal exposure to dexamethasone or cortisol in early pregnancy differentially alters insulin secretion and glucosehomeostasis inadultmale sheepoffspring. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, p. E75–82, 2007.

DE ROOIJ S.R.; PAINTER R.C.; PHILLIPS D.I.; OSMOND C.; TANCK M.W.; DEFESCHE J.C.; et al. The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- gamma2 gene on glucose/insulin metabolism interact with prenatal exposure to famine. **Diabetes Care**; v. 29, p.1052–105, 2006.

DOSTAL L. A.; CHAPIN R. E.; STEFANSKI S. A.; HARRIS M. W.; SCHWETZ B. A. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. **Tox- icol Appl Pharmacol.** v. 95: p. 104–121, 1988.

DOSTAL L.; WEAVER R. P.; SCHWETZ B. Transfer of Di(2-ethylhexyl) Phthalate through Rat Milk and Effects on Milk Composition and the Mammary Gland. **Toxicology and applied pharmacology.** v. 91, p. 315-325, 1987.

ELOBEID A. M; ALLISON B. A. Putative Environmental-Endocrine Disruptors and Obesity: A Review. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 15, n. 5, p. 403–408. doi:10.1097/MED. 0b013e32830ce95c, 2008.

FEIGE N. J.; GELMAN L.; ROSSI D.; ZOETE V.; MÉTIVIER R.; TUDOR C.; SILVIA I. A.; GROSDIDIER A.; LATHION C.; ENGELBORGHES Y.; MICHIELIN O.; WAHLI W.; DESVERGNE B. The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor Modulator That Promotes Adipogenesis. **The journal of biological chemistry**. v. 282, n. 26, p. 19152–19166, 2007.

FEIGE N. J.; GERBER A.; CASALS-CASAS C.; YANG Q.; WINKLER C.; BEDU E.; BUENO M.; GELMAN L.; AUWERX J.; GONZALEZ J. F.; DESVERGNE B. The Pollutant Diethylhexyl Phthalate Regulates Hepatic Energy Metabolism via Species-Specific PPAR $\alpha$ -Dependent Mechanisms. **Environmental Health Perspectives**. v. 118, p. 234, 2010.

FOWDEN L. A.; HILL J. D. **British Medical Bulletin**. V. 60, p. 123–142, 2001.

FREIRE, M. T.; SANTANA I. A.; REYES F. G. Plasticizers in Brazilian food-packaging materials acquired on the retail market. **Food Addit. Contam**, v. 23, p. 93–99, 2006.

GAYATHRI, N.S.; DHANYA C.R.; INDU A.R.; KURUP P.A.; Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing. **Indian J Med Res**, v. 119, p. 139–144, 2004.

GE, R. S.; CHEN, G. R.; DONG, Q.; AKINGBEMI, B.; SOTTAS, C. M.; SANTOS, M.; SEALFON, S. C.; BERNARD, D. G.; HARDY, M. P. Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 513–520, 2007.

GORSKI J.N.; DUNN-MEYNELL A.A.; HARTMAN T.G.; LEVIN B.E.; Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**; v. 291, p. 768–78, 2006.

GRANDE S. W.; ANDRADE A. J.; TALSNESS C. E.; GROTE K.; CHAHOUD I. A Dose-Response Study Following In Utero and Lactational Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate: Effects on Female Rat Reproductive Development. **Toxicological sciences**. v. 91, n.1, p. 247–254, 2006.

GROVE, K. L. et al. Development of metabolic systems. **Physiol Behav**, v. 86, n. 5, p. 646–660, 2005.

GRUN, F.; BLUMBERG, B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol*, v. 04, p. 19–29, 2009.

GUNNARSSON, D.; LEFFLER, P.; EKWURTZEL, E.; MARTINSSON, G.; LIU, K. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. *Reproduction*, v. 135 p. 693-703, 2008.

HATCH, E. E.; NELSON J.W.; STAHLHUT R.W.; WEBSTER T. F. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl*, v.33, p. 324–32, 2010.

HECTORS T. L. M.; VANPARYS C.; VAN DER VEN K.; MARTENS G. A.; JORENS P. G.; VAN GAAL L. F.; COVACI A.; DE COEN W.; BLUST R. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia*. v. 54, p. 1273–1290, 2011.

HEINDEL, J. J. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci*, v.76, p. 247–249, 2003.

HOWARTH, J. A.; PRICE, S. C.; DOBROTA, M.; KENTISH, P. A.; HINTON, R. H. Effects on male rats of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicology Letters*, v. 121, p. 35-43, 2001.

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 125-138, 2008.

ITSUKI-YONEDA, A.; KIMOTO, M.; TSUJI, H.; HIEMORI, M.; YAMASHITA, H. Effect of a hypolipidemic drug, di(2-ethylhexyl) phthalate, on mRNA-expression associated fatty acid and acetate metabolism in rat tissues. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 71, p. 414-420, 2007.

JENSEN A. A. Chemical contaminants in human milk. *Residue Rev.* v. 89, p. I- 128. 1983.

KAVLOCK R.; BOEKELHEIDE K.; CHAPIN R.; CUNNINGHAM M.; FAUSTMAN E.; FOSTER P.; GOLUB M.; HENDERSON R.; HINBERG I.; LITTLE R.; SEED J.; SHEA K.; TABACOVA S.; TYL R.; WILLIAMS P.; ZACHAREWSKI T. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*. v. 16 p. 529–653, 2002.

KURAHASHI N.; KONDO T.; OMURA M.; UMEMURA T.; MA M.; KISHI R. The effects of subacute inhalation of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats. *J Occup Health*. v. 47, p. 437–444, 2005.

LATINI G.; WITTASSEK M.; DEL VECCHIO A.; PRESTA G.; DE FELICE C.; ANGERER J. Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. **Environment International**. v. 35, p. 236–239, 2009.

LIN Y.; WEI J.; LI Y.; CHEN J.; ZHOU Z.; SONG L.; WEI Z.; LV Z.; CHEN X.; XIA W.; XU S. Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, p. E527–E538, 2011.

LJUNGVALL K.; KARLSSON P.; HULTEN F.; MADEJ A.; NORRGREN L.; EINARSSON S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H.; MAGNUSSON U. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di(2-ethylhexyl)phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. **Theriogenology**. v. 64, p. 1170–1184, 2005.

MA, M.; KONDO, T.; BAN, S.; UMEMURA, T.; KURAHASHI, N.; TAKEDA, M.; KISHI, R. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl) phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 164-171, 2006.

MARTINELLI MI.; MOCCHIUTTI N.O.; BERNAL C.A. Dietary di(2-ethylhexyl)phthalate-impaired glucose metabolism in experimental animals. **Hum Exp Toxicol**, v. 25, p. 531–538, 2006.

MARTINO-ANDRADE A. J.; MORAIS R. N.; BOTELHO G.G.; MULLER G.; GRANDE S. W.; CARPENTIERI G. B.; LEÃO G.M.; DALSENTER P. R. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **Int J Androl**. v. 32, n.6 p. 704-12, 2009.

MCALLISTER, E. J.; DHURANDHAR N.V.; KEITH S. W.; ARONNE L.J.; BARGER J.; BASKIN M.; BENCA R.M.; BIGGIO J.; BOGGIANO M. M.; EISENMANN J.C.; ELOBEID M.; FONTAINE K.R.; GLUCKMAN P.; HANLON E.C.; KATZMARZYK P.; PIETROBELLI A.; REDDEN D.T.; RUDEN D.M.; WANG C.; WATERLAND R.A.; WRIGHT S.M.; ALLISON D.B. Ten putative contributors to the obesity epidemic. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v. 49, p. 868–913, 2009.

MEIRHAEGHE, A.; FAJAS L.; HELBECQUE N.; COTTEL D.; LEBEL P.; DALLONGEVILLE J.; DEEB S.; AUWERX J.; AMOUYEL P. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum Mol Genet**, v. 7, n.4 p. 35-40, 1998.

MIGLIARINI B.; PICCINETTI C. C.; MARTELLA A.; MARADONNA F.; GIOACCHINI G.; CARNEVALI O. Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170 p. 416–423, 2011.

MOCCHIUTTI, N. O. BERNAL, C. A. Effects of chronic di(2-ethylhexyl) phthalate intake on the secretion and removal rate of triglyceride-rich lipoproteins in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1017-1021, 1997.

MORAIS R. N.; MUCCIOLO R. G.; GOMES M. L.; LACERDA O.; MORAES W.; MOREIRA N.; GRAHAM L. H.; SWANSON W. F.; BROWN J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, n. 20, p. 27-41, 2002.

MUSHTAQ M.; SRIVASTAVA S. P.; SETH P. K. Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. **Toxicology**, v. 16, p. 53–161, 1980.

NAIR, N., KURUP, C. K. Investigations on the mechanism of the hypocholesterolemic action of diethylhexyl phthalate in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, p. 3441-3447, 1986.

NEUMANN, F. Early indicators for carcinogenesis in sex-hormone-sensitive organs. **Mutat. Res.** v. 248, p. 341–356, 1991.

NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS E.; JEFFERSON W.N.; Environmental estrogens and obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 304, p. 84–89, 2009.

OISHI, S. Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on lipid composition of serum and testis in rats. **Toxicology Letters**, v. 23, p. 67-72, 1984.

PARKS L. G., OSTBY, J. S.; LAMBRIGHT C. R.; ABBOTT B. D.; LINEFELTER G. R.; BARLOW N. J.; GRAY L. E. The Plasticizer Diethylhexyl Phthalate Induces Malformations by Decreasing Fetal Testosterone Synthesis during Sexual Differentiation in the Male Rat. **Toxicological sciences**, v. 58, p. 339–349, 2000.

PARMAR D., SRIVASTAVA S. P., SRIVASTAVA, S. P., AND SETH P. K. Hepatic mixed function oxidases and cytochrome P-450 contents in rat pups exposed to di-(2-ethylhexyl)phthalate through mother's milk. **Drug Metab. Dispos.** v.13, p. 368-370, 1985.

PATEL, S. M; SRINIVASAN, M. Metabolic Programming in the Immediate Postnatal Life. **Ann Nutr Metab**, v. 58, n. 2, p.18–28, 2011.

POON, R.; LECAVALIER, P.; MUELLER, R.; VALLI, V. E.; PROCTER, B. G.; CHU, I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 225-239, 1997.

RENGARAJAN S.; PARTHASARATHY C ANITHA M.; BALASUBRAMANIAN K. Diethyl- hexyl phthalate impairs insulin binding and glucose oxidation in Chang liver cells. **Toxicol In Vitro**. v. 21, p. 99–102, 2007.

RINAUDO, P; WANG, E. Fetal Programming and Metabolic Syndrome. **Rev. Physiol**, v. 74, p. 107-130, 2012.

RISTOW, M., MÜLLER-WIELAND D.; PFEIFFER A.; KRONE W.; KAHN C.R.; Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. **N Engl J Med**, v. 339, p. 953-9, 1998.

RUSYN, I.; PETERS, J. M.; CUNNINGHAM, M. L. Modes of action and species-specific effects of di(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 459-479, 2006.

SCHOONJANS, K. Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **J Lipid Res**, v. 37, p. 907-25, 1996.

SCHOONJANS, K.; WATANABE M.; SUZUKI H.; MAHFOUDI A.; KREY G.; WAHLI W.; GRIMALDI P.; STAELS B.; YAMAMOTO T.; AUWERX J. Induction of the acylcoenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in the C promoter. **J Biol Chem**, v. 270, n. 192 p. 69-76, 1995.

SCOW R. O., HAMOSH M., BLANCHETTE-MACKIE E. J., EVANS, A. J. Uptake of blood triglyceride by various tissues. **Lipids**. v. 7, p. 497-505, 1972.

SEKI, Y.; WILLIAMS L.; VUGUIN P.M.; CHARRON M.J. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1031–1038, 2012.

SFEIR, Z.; IBRAHIMI A.; AMRI E.; GRIMALDI P.; ABUMRAD N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 57, p. 17-21, 1997.

SOMM E.; SCHWITZGEBEL V. M.; VAUTHAY D.M.; CAMM E.J.; CHEN C.Y.; GIACOBINO J.P.; SIZONENKO S. V.; AUBERT M.L.; HÜPPI P. S. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. **Endocrinology**. v. 149, n. 12, p. 89-99, 2008.



SUTTON, R. et al. An improved method for the isolation of islets of Langerhans from the adult rat pancreas. *Transplantation Proceedings* v. 18, p. 1819–1820, 1986.

TAVARES, V.; HIRATA M.H.; HIRATA R. D. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 4, p. 526-533, 2007.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp Physiol**, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

TONTONOZ, P.; HU E.; SPIEGELMAN B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid activated transcription factor. **Cell**. v. 79, n. 11, p.47-56, 1994.

VALTAT, B; DUPUIS, D; ZENATY, D; SINGH-ESTIVALET, A; TRONCHE, F; BRÉANT, B; BLONDEAU, B. Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice. **Diabetologia**. v. 54, p. 350-359, 2011.

WEI, J. Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-Fat Diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3049–3061, 2011.

XU Y.; KNIPP G. T.; COOK J. T. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate and its metabolites on the lipid profiling in rat HRP-1 trophoblast cells. **Arch Toxicol**, v. 80, p. 293–298, 2006.

XU, Y.; AGRAWAL, S.; COOK, T. J.; KNIPP, G. T. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal brain upon maternal exposure. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 57-62, 2007.

YAKUSHIJI T.; WATANABE I., KUWABARA K., YOSHIDA S., KOYAMA K., KUNITA N. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in human milk and blood collected in Osaka prefecture from 1972 to 1977. In. **Arch. Occup. Environ. Health**. v. 43, p. 1-15, 1979.

ZAMBRANO E.; BAUTISTA C.J.; DEÁS M.; MARTÍNEZ-SAMAYOA P.M.; GONZÁLEZ-ZAMORANO M.; LEDESMA H.; et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J Physiol**; v. 571, n. 2, p. 21–30, 2006.